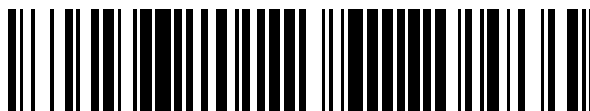


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 787**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09822342 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2340307**

54 Título: **Ácidos ribonucleicos de doble cadena con estructura fisicoquímica robusta y actividad biológica muy específica**

30 Prioridad:

23.10.2008 US 193030 P

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

11.12.2015

73 Titular/es:

**HEMISPHERX BIOPHARMA, INC. (100.0%)
One Penn Center 1617 Jfk Boulevard
Philadelphia, PA 19103, US**

72 Inventor/es:

**CARTER, WILLIAM A. y
STRAYER, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 787 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

Ácidos ribonucleicos de doble cadena con estructura fisicoquímica robusta y actividad biológica muy específica

5 Campo de la invención

La invención se refiere a nuestro descubrimiento de un nuevo ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) que tiene actividades biológicas específicas, lo que incluye que actúa como un agonista selectivo para la activación del receptor tipo toll 3 (TLR3). Su estructura molecular “robusta”, tal como se mide mediante técnicas fisicoquímicas, es resistente al despliegue molecular (es decir, a la desnaturalización). Esta estructura parece ser responsable del aumento de la eficacia del ARNdc en aplicaciones terapéuticas y de la mejora de la actividad biológica (por ejemplo, usado como un agente inmunorregulador).

Antecedentes de la invención

AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) fue desarrollado como un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) sintético para aplicaciones terapéuticas basado en el conocimiento de los efectos tanto beneficiosos como adversos inducidos por poli(I):poli(C) en la fisiología de un sujeto. Trabajando con la hipótesis de que los requisitos de la secuencia de nucleótidos para obtener efectos beneficiosos y adversos son diferentes, desarrollamos poli(I):poli(C₁₂U) para conservar los aspectos beneficiosos del ARNdc sin los efectos adversos de poli(I):poli(C) mediante la modificación de la estructura de este último con la introducción ocasional de uridilato en la cadena de poli(C) para producir dúplex que contienen regiones específicamente configuradas sin apareamiento de bases (es decir, “apareamiento erróneo”) en la posición de la modificación. Estas regiones aceleran la hidrólisis del ARNdc y disminuyen la toxicidad (Greene, 1984). Por otro lado, la capacidad de inducir la síntesis de interferón se mantenía siempre que el ARNdc modificado persistiera durante una semivida de al menos cinco minutos y la frecuencia de la inserción aleatoria en la cadena del poli(ácido ribocitidílico) no fuese mayor de cada 0,5 a 1,0 vuelta de hélice del ARNdc perfectamente apareado (Brodsky, 1987).

Aunque el poli(I):poli(C₁₂U) es estable en solución, es susceptible a la hidrólisis como el resto de ácidos nucleicos convencionales. La hidrólisis es muy dependiente de la estructura del ácido nucleico, así como de la presencia de nucleasa y cationes divalentes, pH y temperatura. El ARN es más susceptible a la hidrólisis que el ADN debido al grupo 2'-OH presente en el primero, lo que facilita la hidrólisis. Por otra parte, el poli(I):poli(C₁₂U) fue diseñado para degradarse más rápidamente que otros ARNdc en un entorno que contiene nucleasa, tales como la sangre y otros fluidos de tejidos. Los ácidos nucleicos son inicialmente estables en tampones salinos fisiológicos a temperatura ambiente, aunque comienzan a degradarse gradualmente con el tiempo. Esta velocidad de hidrólisis es dependiente de la temperatura, aumentando en gran medida a temperaturas más altas.

Las propiedades de poli(I):poli(C₁₂U) se caracterizan por ensayos físico-químicos, como se muestra en la Tabla 1. El dicroísmo circular (DC) (por ejemplo, la elipticidad, el comportamiento de fusión) se utiliza para caracterizar la estructura de ARN de doble hélice, que es crítica para la potencia. En pocas palabras, el receptor de tipo toll 3 (TLR3) es activado por el ARNdc (Alexopoulou, 2001), lo que conduce a una secuencia de reclutamiento de defensa del hospedador y, en última instancia, a la producción de interferones tipo I (Schroeder, 2005). La iniciación de la producción de interferón por la unión del ARNdc a TLR3 requiere la estructura helicoidal del ARN (Bell, 2006). Aunque la difracción de rayos X y la RMN por sí solas son las técnicas definitivas para determinar la estructura de segundo orden del ARN, la medición de DC con una combinación de modos de barrido y estrés térmico también puede proporcionar una caracterización precisa de la estructura de doble hélice crítica. De hecho, los cambios de menor importancia en la estructura de segundo orden de los polinucleótidos se han medido por DC (Gray, 1995), incluyendo los efectos de la unión del ligando (Sumita, 2005).

Tabla 1. Actividad biológica y atributos medidos

| Propiedad medida | Atributo de identidad | Atributo de actividad |
|---|--|-----------------------|
| <i>Conformación: Segundo grado</i> | | |
| DC: Elipticidad | ARN de doble cadena: integridad de la hélice | Unión a TLR3 |
| DC: Comportamiento de fusión: Punto de fusión Amplitud ½ | ARN de doble cadena: integridad y uniformidad de la hélice | Unión a TLR3 |
| <i>Composición y tamaño</i> | | |
| Tamaño máximo | Nº de unidades de repetición | semivida: seguridad |
| Relación C:U | Identidad | semivida: seguridad |

Por lo tanto, el dicroísmo circular se puede emplear para caracterizar la potencia terapéutica del ARNdc específicamente configurado, incluyendo el poli(I):poli(C₁₂U).

En cuanto a los efectos tóxicos adversos, la semivida del poli(I):poli(C₁₂U) se redujo a un nivel seguro de aproximadamente 4 a 5 minutos por sustitución precisa de la cadena de poli(C), específicamente la relación citidina:uridina (patente US- 5.258.369). La introducción de la base uracilo no emparejada en la cadena de poli(C) en una proporción de 1:12 (Greene, 1978) dio lugar a una longitud de bases emparejadas mínima de aproximadamente una vuelta de la hélice, que es la que se requiere para la interacción del ARNdc con su receptor bioactivo. Además, la imposición de una limitación del tamaño máximo de alrededor de 350 unidades de repetición en el ARNdc dio como resultado una semivida de aproximadamente 4 a 5 minutos (Greene, 1978; Pitha, 1972).

El documento WO 2008/109083 describe también AMPLIGEN y divulga un ARNdc de la fórmula $rI_n \cdot r(C_{12}U)_n$ donde n es un número entero de 4 a 29.

Era nuestro objetivo identificar una nueva familia de ARNdc mejorado con estructura físico-química específica y actividades biológicas muy específicas, lo que incluye actuar como un agonista selectivo de TLR3. Su estructura robusta, medida por técnicas fisicoquímicas es resistente al despliegue molecular (es decir, la desnaturalización). La mejora en al menos una o más actividades biológicas puede ser consecuencia de la estructura robusta de esta forma particular de poli(I):poli(C₁₂U). Otras ventajas y mejoras se describen a continuación, o serían evidentes a partir de la presente memoria de la divulgación.

Sumario de la invención

Es un objetivo de la invención proporcionar formas mejoradas de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc). Su estructura físico-química y actividades biológicas se describen en la presente memoria. Una molécula "robusta" resistente al despliegue (es decir, la desnaturalización) de su estructura helicoidal tiene actividad de ARNdc mejorada como un agonista selectivo de los receptores tipo toll 3 (TLR3). Se espera que al menos la purificación parcial de un ARNdc robusto de otros ARNdc después de la síntesis presente una mayor especificidad en su uso como un medicamento y, por lo tanto, menos efectos adversos atribuibles al ARNdc que no son robustos.

Un primer aspecto de la invención proporciona un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, caracterizado por que:

el ARNdc tiene un peso molecular de aproximadamente 250 kDa a aproximadamente 320 kDa y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, caracterizado por que:

el ARNdc tiene al menos una cadena de una longitud de aproximadamente 380 bases a aproximadamente 450 bases y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, caracterizado por que:

el ARNdc tiene desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 38 vueltas de hélice de cadenas de ARNdc y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.

El ARNdc robusto puede aislarse sometiendo al menos las cadenas parcialmente hibridadas de una población de ARNdc sintetizado, a condiciones que desnaturalizan la mayor parte del ARNdc (al menos 50 % en moles, al menos 80 % en moles, al menos 90 % en moles, o al menos 95 % en moles) de la población y seleccionando a continuación negativamente o positivamente (o ambas cosas) el ARNdc que permanece parcialmente hibridado. La pureza del ARNdc robusto puede así aumentarse desde menos de aproximadamente 0,1-10 % en moles (por ejemplo, menos de aproximadamente 5 % en moles) con respecto a todos los ARN en la población después de la síntesis. Se prefiere que el ARNdc robusto sea más de aproximadamente 80 a 98 % en moles con respecto a todos los ARN presentes en la misma mezcla con el ARNdc robusto (al menos 80 % en moles, al menos 90 % en moles, al menos 95 % en moles, o por lo menos 98 % en moles) después de la selección. Las condiciones de desnaturalización para desplegar al menos las cadenas parcialmente hibridadas de ARNdc pueden comprender la elección adecuada de sales tampón, pH, disolvente, temperatura o cualquier combinación de las mismas. Las condiciones pueden ser determinadas empíricamente mediante la observación del despliegue o la fusión de las

cadena dúplex de ácido ribonucleico. El rendimiento de ARNdc robusto puede mejorarse mediante hidrólisis parcial de cadenas más largas de ácido ribonucleico y seleccionando, a continuación, cadenas hibridadas de tamaño y resistencia adecuada a la desnaturalización.

- 5 El peso molecular del ARNdc robusto puede ser de aproximadamente 250 kDa a aproximadamente 320 kDa, o de aproximadamente 270 kDa a aproximadamente 300 kDa. Las longitudes de una cadena sencilla o de ambas cadenas del ARNdc robusto pueden ser de aproximadamente 380 bases a aproximadamente 450 bases, o de aproximadamente 400 bases a aproximadamente 430 bases. El número de vueltas de hélice realizadas por las cadenas de ARNdc robusto pueden ser de aproximadamente 30 a aproximadamente 38, o de aproximadamente 32 a aproximadamente 36.

- 15 Al menos uno o más ARNdc robustos diferentes se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente humano o animal) en necesidad de tal tratamiento. El ARNdc robusto se puede administrar en una dosificación de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 60 mg/dosis. Esta dosis puede administrarse una vez por semana o mes, o dos o más dosis por semana o mes. Cada dosis (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 40 mg, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20 mg) puede ser proporcionada al sujeto sin limitación a la formulación de la composición farmacéutica, o su vía de administración (aunque se prefiere la infusión intravenosa). El uso de una cantidad eficaz de ARNdc robusto para lograr una sensación de mejora de la salud puede continuarse hasta que se mejora al menos un síntoma. La cantidad eficaz necesaria para obtener dicha mejora puede ser idéntica o superior a la cantidad necesaria para el mantenimiento del efecto(s).

- 25 El ARNdc robusto puede actuar específicamente a través de un receptor TLR3. La función y el fenotipo de las células dendríticas pueden ser normalizadas en un sujeto (por ejemplo, paciente humano o animal). La administración de al menos una cantidad eficaz de uno o más ARNdc robustos a un sujeto (por ejemplo, paciente humano o animal) puede de este modo disminuir el número o reducir la gravedad de los síntomas cuando el sujeto está afectado por una enfermedad u otro trastorno patológico. El uso de ARNdc robusto puede corregir anomalías de maduración de células dendríticas en el sujeto sin el peligro de inducir una tormenta de citocinas.

- 30 Las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, linfocitos B) y tejidos de las mucosas (por ejemplo, epitelio, gástrico o respiratorio) son dianas preferidas en el cuerpo para el ARNdc robusto. Uno o más antígenos pueden ser presentados a las células del sistema inmunitario y el antígeno(s) debe ser susceptible a la acción del ARNdc robusto que actúa selectivamente como un agonista de TLR3. Las células del sistema inmunitario, microbios, células cancerosas, u otras células transformadas pueden ser susceptibles a los patrones de respuesta de citocinas específicas activadas por ARNdc robusto actuando selectivamente como agonista de TLR3. El ARNdc robusto se administra preferiblemente por infusión intravenosa, inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular, inhalación intranasal o intratraqueal o administración orofaríngea o sublingual.

- 40 En otro aspecto, se proporciona un medicamento como una composición farmacéutica. Se pueden usar uno o más diferentes ARNdc robustos para su efecto beneficioso(s) sobre la salud de un sujeto, como agonista(s) de TLR3 selectivo), para tratar una enfermedad u otro trastorno patológico, o para la fabricación de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de una enfermedad u otro trastorno patológico. Los componentes inertes opcionales de la composición incluyen excipientes y un vehículo (por ejemplo, tampón salino o agua) en un envase monodosis o en un envase multidosis (por ejemplo, un vial o viales de inyección), e instrucciones para su uso. También se proporcionan procedimientos para preparar y usar la composición farmacéutica (medicamento). Por ejemplo, uno o más diferentes ARNdc robustos se pueden formular a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,25 mg/ml (por ejemplo, 10 mg disueltos en 4 ml o 20 mg disueltos en 8 ml) en solución salina fisiológica tamponada con fosfato y conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C en una nevera en condiciones asépticas.

- 50 Otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de nuestra descripción de las realizaciones específicas y las reivindicaciones adjuntas, y generalizaciones a las mismas.

Breve descripción de las figuras

- 55 La Figura 1 muestra un cromatograma de HPLC para el poli(I):poli(C₁₂U). El pico menor centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 5,01 min es poli(I):poli(C₁₂U) de doble cadena. El primer pico principal centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 7,58 min es el poli(C₁₂U) monocatenario. El segundo pico principal centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 10,05 min es el poli(I) monocatenario. La identidad molecular de cada pico se determinó mediante análisis de matriz de fotodiodos (MFD).

- 60 La Figura 2 muestra análisis de MFD de los tres picos de HPLC. El acetonitrilo, que se utiliza como disolvente, es responsable de la absorbancia a 230 nm. La absorbancia a 245 nm indica la presencia de poli(I); la absorbancia a 265 nm indica la presencia de poli(C₁₂U). La Fig.2A es el análisis de MFD del pico centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 5,01 min, que contiene poli(I) y poli(C₁₂U). La Figura 2B es el análisis de MFD del pico centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 7,58 min, que contiene poli(C₁₂U). La Figura 2C es el análisis de MFD del pico centrado en un tiempo de retención de aproximadamente 10,05 min, que contiene

poli(I).

La Figura 3 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño de los complejos de TLR3-ECD y poli(I):poli(C₁₂U) (Fig.3A), el receptor de TLR3-ECD solamente (Fig. 3B) y el ligando poli(I):poli(C₁₂U) solamente (Fig. 3C).

La Figura 4 muestra el efecto del estrés térmico (40 °C) sobre el tamaño del ARNdc tal como se mide por centrifugación analítica. La disminución en el coeficiente de sedimentación (S_{20, w}) refleja una pérdida de tamaño debido a la hidrólisis.

La Figura 5 muestra el efecto del estrés térmico (40 °C) sobre el tamaño del ARNdc tal como se mide por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El pico del ARNdc robusto a medida que se hidrolizan las cadenas de poli(I) y poli(C₁₂U).

Descripción de realizaciones específicas

Se conocen muchos usos del ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc). La eficacia de tales tratamientos, que incluye una disminución en el número y/o una reducción en la gravedad de los efectos adversos de poblaciones no seleccionadas de ARNdc, se mejora por el uso de ARNdc robusto al menos parcialmente purificado. El ARNdc robusto de la invención puede ser usado para tratar a un sujeto (por ejemplo, ser humano o animal, especialmente aves, peces o mamíferos) con una infección microbiana incipiente o establecida, para tratar a un sujeto por otros trastornos patológicos caracterizados por la proliferación celular anormal (por ejemplo, neoplasia o tumor), o para su uso como un inmunostimulante para tratar al sujeto por una enfermedad u otro trastorno patológico causado por, al menos, infección, proliferación celular anormal, síndrome de fatiga crónica o daño celular por autoinmunidad o neurodegeneración. Se prefiere que la cantidad de ARNdc robusto utilizado sea suficiente para unir el receptor tipo toll 3 (TLR3) de las células inmunitarias del sujeto. La inmunidad innata o adaptativa puede ser desencadenada por el mismo. Preferiblemente, el ARNdc robusto puede usarse para activar TLR3 selectivamente sin activar otros receptores tipo toll, como TLR4 o una ARNA helicasa como RIG-I o mda-5, o sin inducir una respuesta pro-inflamatoria excesiva como se ve con el agonista de TLR3 no selectivo poli(I):poli(C) en un fenómeno conocido como "tormenta de citocinas" en la técnica.

El sujeto puede estar infectado con al menos una o más bacterias, protozoos o virus. Se administra al sujeto una composición farmacéutica que se compone de ARNdc robusto en una cantidad suficiente para unirse a TLR3. La infección del sujeto se reduce o elimina de ese modo como se ha ensayado por la disminución del tiempo de recuperación, el aumento de la inmunidad (por ejemplo, aumento del título de anticuerpos, la proliferación de linfocitos, la destrucción de células infectadas, o la actividad de células asesinas naturales), la disminución de la división o el crecimiento del microbio, o cualquier combinación de estas en comparación con el sujeto no tratado con el ARNdc robusto. La inmunidad inducida por el tratamiento es preferiblemente específica para el microbio, aunque la inducción de la inmunidad innata también puede ser eficaz.

Se puede tratar una infección causada por un microbio. El microbio puede infectar a un sujeto humano o animal. La infección puede ser incipiente o establecida. El microbio puede ser una bacteria, protozoo, o virus; especialmente los que causan la enfermedad (es decir, los microbios patógenos). Aquí, los términos "microbio" y "microorganismo" se usan indistintamente.

La bacteria puede ser una especie del género *Bacillus* (por ejemplo, *B. anthracis*, *B. cereus*), *Bartonella* (*B. henselae*), *Bordetella* (por ejemplo, *B. pertussis*), *Borrelia* (por ejemplo, *B. burgdorferi*), *Brucella* (por ejemplo, *B. abortus*), *Campylobacter* (por ejemplo, *C. jejuni*), *Chlamydia* (por ejemplo, *C. pneumoniae*), *Clostridium* (por ejemplo, *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. tetani*), *Corynebacterium* (por ejemplo, *C. amycolatum*, *C. diphtheriae*), *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli* O175:H7), *Haemophilus* (por ejemplo, *H. influenzae*), *Heliobacter* (por ejemplo, *H. pylori*), *Klebsiella* (*K. pneumoniae*), *Legionella* (por ejemplo, *L. pneumophila*), *Listeria* (por ejemplo, *L. monocytogenes*), *Mycobacterium* (por ejemplo, *M. avium*, *M. bovis*, *M. branderi*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*), *Mycoplasma* (por ejemplo, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*), *Neisseria* (por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*), *Pneumocystis* (por ejemplo, *P. carinii*), *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*), *Rickettsia*, (por ejemplo, *R. rickettsia*, *R. typhi*), *Salmonella* (por ejemplo, *S. enterica*), *Shigella* (por ejemplo, *S. dysenteriae*), *Staphylococcus* (por ejemplo, *S. aureus*, *S. epidermidis*), *Streptococcus* (por ejemplo, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*), *Treponema* (por ejemplo, *T. pallidum*), *Vibrio* (por ejemplo, *V. cholerae*, *V. vulnificus*), or *Yersinia* (por ejemplo, *Y. pestis*). Aquí se incluyen bacterias gram-negativas o gram-positivas, clamidia, espiroquetas, micobacterias y micoplasmas.

El protozoo puede ser una especie del género *Cryptosporidium* (por ejemplo, *C. hominis*, *C. parvum*), *Entamoeba* (por ejemplo, *E. histolytica*), *Giardia* (por ejemplo, *G. intestinalis*, *G. lamblia*), *Leishmania* (por ejemplo, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. tropica*), *Plasmodium* (por ejemplo, *P. falciparum*, *P. vivax*), *Toxoplasma* (por ejemplo, *T. gondii*) o *Trypanosoma* (por ejemplo, *T. brucei*, *T. cruzi*).

El virus puede ser un virus de ADN o ARN que infecta a los seres humanos y animales. Virus de ADN incluyen los pertenecientes a las familias *Adenoviridae*, *Iridoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae* y *Poxviridae* (Grupo I virus de ADN de doble cadena); la familia *Parvoviridae* (Grupo II virus de ADN de cadena sencilla). Los virus ARN incluyen los pertenecientes a las familias *Birnaviridae* y *Reoviridae* (Grupo III virus de ADN de doble cadena); las familias *Arteriviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae* y *Roniviridae* (Grupo IV virus de ARN de cadena sencilla positivo) y las familias *Arenaviridae*, *Bornaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* y

Rhabdoviridae (Grupo V virus de ARN de cadena sencilla negativo). El ARNdc robusto también se puede utilizar para tratar la infección por virus de ADN de la familia *Herpesviridae* y por virus de ARN virus de las familias *Flaviviridae*, *Hepadnaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Retroviridae* y *Togaviridae*.

- 5 El sujeto puede estar afectado por una enfermedad o trastorno patológico que se caracteriza por la proliferación anormal de células (por ejemplo, neoplasia o tumor, otras células transformadas). Se administra al sujeto una composición farmacéutica que se compone de ARNdc robusto en una cantidad suficiente para unirse a TLR3. La enfermedad, los síntomas de la misma, su número, o su gravedad en el sujeto puede ser reducida o eliminada de ese modo como se ha ensayado por la mejora en la morbilidad o mortalidad, el aumento de la inmunidad (por ejemplo, aumento del título de anticuerpos, la proliferación de linfocitos, la destrucción de células en proliferación o transformadas o actividad de las células asesinas), la disminución de la división o crecimiento de células en proliferación o transformadas o cualquier combinación de estas mismos en comparación con el sujeto no tratado con el ARNdc robusto.
- 10
- 15 Las células del sujeto que sufren una proliferación anormal pueden constituir una neoplasia o tumor (por ejemplo, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma), especialmente las células transformadas por un virus tumoral (por ejemplo, virus de ADN o virus de ARN que lleva un gen u oncogén transformante) o que son de otro modo infectadas por un virus asociado con el cáncer. Por ejemplo, el virus de Epstein-Barr se asocia con el cáncer nasofaríngeo, el linfoma de Hodgkin, el linfoma de Burkitt, y otros linfomas; los virus de hepatitis B y C humana (VHB y VHC) están asociados con el cáncer de hígado; el virus del herpes humano 8 (VHH-8) está asociado con el sarcoma de Kaposi; el virus del papiloma humano (por ejemplo, VPH6, VPH11, VPH16, VPH18, o combinación de ellos) están asociados con el cáncer cervical, el cáncer anal y las verrugas genitales y el virus linfotrópico-T humano (VLTH) está asociado con la leucemia de linfocitos T y el linfoma. Los cánceres incluyen aquellos que se originan en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, esófago, colon, intestino, íleon, recto, ano, hígado, páncreas, estómago), genitourinario (por ejemplo, vejiga, riñón, próstata), musculoesquelético, nervioso, pulmonar (por ejemplo, pulmón) o sistemas de órganos reproductivos (por ejemplo, cuello uterino, ovario, testículo).
- 20
- 25

La maduración de células dendríticas puede inducirse en el sujeto. Las células dendríticas inmaduras, que son capaces de captar antígenos, pueden inducirse a diferenciarse en células dendríticas más maduras, que pueden presentar antígenos y cebar una respuesta inmunitaria adaptativa (por ejemplo, linfocitos T específicos de antígeno). Durante su conversión de células dendríticas inmaduras en maduras, estas pueden cambiar al menos la expresión de la superficie celular del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión, o receptores de quimiocinas; disminuir la captación de antígenos; aumentar la secreción de quimiocinas, citocinas o proteasas; hacer crecer procesos dendríticos; reorganizar su citoesqueleto; o cualquier combinación de los mismos. Pueden inducirse a migrar a sitios de inflamación o del tejido linfoide a través de la sangre o la linfa para traer a las proximidades microbios, células neoplásicas o tumorales, u otras células transformadas.

30

35

El sujeto puede vacunarse contra al menos una infección o cáncer. En algunos casos, por ejemplo, los cánceres inducidos por virus, tanto la infección como el cáncer pueden ser tratados. Inmediatamente antes, durante, o inmediatamente después de la vacunación (por ejemplo, dentro de los 10 días de la vacunación), se administra al sujeto un medicamento o una composición farmacéutica que se compone de ARNdc robusto en una cantidad suficiente para unirse a TLR3. De esta forma, se estimula la respuesta inmunitaria a una vacuna o preparación de células dendríticas. La vacuna o preparación de células dendríticas puede estar compuesta de microbios o células enteras muertas, fijas o atenuadas (por ejemplo, en proliferación o transformadas); un lisado o fracción purificada de microbios o células (por ejemplo, en proliferación o transformadas); uno o más antígenos microbianos aislados (por ejemplo, nativos, sintetizados químicamente, o producidos de forma recombinante); o uno o más antígenos tumorales aislados (por ejemplo, nativos, sintetizados químicamente, o producidos de manera recombinante). La vacunación in situ puede lograrse tras la producción por el sujeto del antígeno en un sitio o en la circulación (por ejemplo, producido en una infección natural o crecimiento celular o antígeno circulante) y el ARNdc robusto puede actuar como un adyuvante en el mismo.

40

45

50

Una cadena de poli(ácido riboinosínico) puede estar parcialmente hibridada con una cadena de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico), poli(ácido ribocitidílico₁₁₋₁₄uridílico) o poli(ácido ribocitidílico₁₂uridílico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo (es decir, no existe apareamiento de bases en la posición de desapareamiento). ARNdc configurados específicamente incluyen: ribo(I) · ribo(C₄, U), ribo(I) · ribo(C₁₁, U), ribo(I) · ribo(C₁₃, U), ribo(I) · ribo(C₁₈, U) y ribo(I) · r(C₂₀, U). Los ARNdc configurados específicamente también pueden estar modificados en los extremos de la molécula para añadir una bisagra(s) para evitar el deslizamiento de los pares de bases, confiriendo de este modo una bioactividad específica en disolventes o entornos acuosos que existen en los fluidos biológicos humanos. Los ARNdc configurados específicamente descritos en las patentes US-4.024.222; US-4.130.641 y US-5.258.369 (incorporados por referencia) son generalmente adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención después de la selección para ARNdc robusto. Uno o más ARNdc robusto pueden formar complejos con un polímero estabilizante tal como polilisina, polilisina, más carboximetilcelulosa, poliarginina, poliarginina más carboximetilcelulosa o cualquier combinación de los mismos.

55

60

65 El ARNdc robusto como al menos una porción de un medicamento o formulado con otros componentes compatibles en una composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, paciente humano o animal,

especialmente aves, peces o mamíferos) por cualquier vía local o sistémica conocida en la técnica, incluyendo enteral (por ejemplo, oral, tubo de alimentación, enema), tópica (por ejemplo, dispositivo tal como un nebulizador para inhalación a través del sistema respiratorio, parche dérmico de acción epicutánea o transdérmica, supositorio que actúa en el recto o vagina) y parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intradérmica o intraperitoneal; bucal, sublingual o transmucosa; inhalación o instilación intranasal o intratraqueal). El ARNdc robusto puede estar micronizado por molienda o trituración del material sólido, disuelto en un vehículo (por ejemplo, solución salina tamponada estéril o agua) para inyección o instilación (por ejemplo, aerosol), aplicarse tópicamente o estar encapsulado en un liposoma u otro vehículo para la administración dirigida. Se prefiere la disolución del ARNdc robusto en agua para inyección (WFI) y la inyección de la composición en el sujeto. Se puede utilizar un vehículo para dirigir el ARNdc robusto al receptor TLR3 sobre las células presentadoras de antígeno y el epitelio. Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras pueden ser contactadas en los tejidos de la piel, mucosa o linfoide. Se apreciará que la vía preferida puede variar con la edad, condición, sexo o estado de salud del sujeto; la naturaleza de la enfermedad u otro trastorno patológico, incluyendo el número y la gravedad de los síntomas y el principio activo elegido.

Las formulaciones para administración (es decir, composiciones farmacéuticas) pueden incluir soluciones acuosas, jarabes, elixires, polvos, gránulos, comprimidos y cápsulas que contienen generalmente excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, conservantes, sales tampón, aromatizantes, colorantes y/o agentes edulcorantes. Se apreciará que la formulación preferida puede variar con la edad, condición, sexo o estado de salud del sujeto; la naturaleza de la enfermedad u otro trastorno patológico, incluyendo el número y la gravedad de los síntomas y el principio activo elegido.

La dosis recomendada de ARNdc robusto dependerá del estado clínico del sujeto y el tratamiento de la experiencia del médico o el veterinario en el tratamiento de la enfermedad u otro trastorno patológico. El ARNdc robusto puede administrarse a una dosis de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 40 mg o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 20 mg en un sujeto (por ejemplo, de masa corporal de aproximadamente 70-80 kg para un paciente ser humano) en una pauta de una a tres veces por semana (preferiblemente dos veces por semana), aunque la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede ser variada por el médico o veterinario en respuesta a los síntomas del sujeto. El ácido nucleico en forma sólida se puede disolver en solución salina fisiológica tamponada con fosfato y posteriormente perfundirse por vía intravenosa. Las células o tejidos que expresan TLR3 son sitios preferidos en el sujeto para la administración del ácido nucleico, especialmente la célula presentadora de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, linfocitos B) y el endotelio (por ejemplo, células endoteliales de los sistemas respiratorio y gástrico). Se apreciará que la dosis preferida puede variar con la edad, condición, sexo o estado de salud del sujeto; la naturaleza de la enfermedad u otro trastorno patológico, incluyendo el número y la gravedad de los síntomas y el principio activo elegido.

Las células dendríticas que actúan como células centinela poseen estructuras superficiales moleculares que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Estos PMAP incluyen un conjunto de receptores tipo toll (TLR) que reconocen específicamente todos los ARNdc. En particular, el ARNdc es un agonista selectivo de TLR3. El ARNdc robusto se puede usar como un agente selectivo para la activación de TLR3. La disfunción en la señalización de la molécula co-estimuladora (por ejemplo, CD80, CD83, CD86) en las células dendríticas puede estar asociada con la enfermedad u otro trastorno patológico a tratar. Esta anomalía puede ser normalizada mediante el uso de ARNdc robusto como un agonista de TLR3 selectivo. Los efectos del ARNdc robusto pueden ser inhibidos o bloqueados por mutación del gen de TLR3 (por ejemplo, delección), regulando a la baja su expresión (por ejemplo, ARNsi), la unión con un competidor por el sitio de unión al ligando de TLR3 (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) o una antagonista del receptor o interfiriendo con un componente de etapas posteriores de la vía de señalización de TLR3 (por ejemplo, MyD88 o TRIF).

El dicroísmo circular (DC) es una técnica físico-química para la caracterización de la conformación del ARNdc configurado específicamente. También se puede utilizar como un indicador directo para la unión de AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) como un agonista del receptor a su receptor TLR3. Además, la estructura helicoidal del ARNdc robusto y los requisitos estructurales para la unión del ARNdc configurado específicamente para TLR3 se pueden caracterizar precisamente por DC.

Otras técnicas físico-químicas que pueden utilizarse para caracterizar el ARNdc robusto son la cromatografía de fase inversa, el análisis de MFD (matriz de fotiodos), la cromatografía de presión de gas (CPG), la unión específica del ligando al receptor TLR3 y la velocidad de sedimentación medida por ultracentrifugación.

El ARNdc robusto proporciona un agente selectivo para el análisis minucioso de los efectos de la activación de TLR3 en el sistema inmunitario que no estaba disponible anteriormente con tal potencia. Otros agentes como los adaptadores de TLR3 MyD88 y TRIF median la señalización de todos los TLR o TLR3/TLR4, respectivamente. Así, la activación o inhibición de la señalización a través de MyD88 o TRIF no restringiría los efectos biológicos a aquellas mediados por TLR3. Dado que la presencia de TLR3 y su señalización es un requisito para que AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) actúe como un agonista del receptor, se podría analizar la ausencia de mutaciones de TLR3, la presencia de proteína TLR3, la señalización intacta mediada por TLR3 o cualquier

combinación de los mismos en la célula o tejido de un sujeto antes de la administración del agonista. Dicha confirmación de la actividad TLR3 se puede realizar antes, durante o después de la administración del agonista. El agonista se puede utilizar para restringir la respuesta inmunitaria a la activación de TLR3 sin activar otros receptores de tipo toll o ARN helicinas. Por ejemplo, la producción anormal de citocinas (por ejemplo, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12) o la señalización de la molécula co-estimuladora (por ejemplo, CD80, CD83, CD86) de señalización puede ser el resultado de, al menos, la infección por el microbio, la proliferación celular anormal, el daño autoinmunitario o la neurodegeneración. Esta anomalía puede ser modulada mediante el uso de ARNdc robusto como un agonista selectivo de TLR3. La presentación del antígeno se puede mejorar mediante la conjugación del antígeno (o un análogo de péptido del mismo) a un ligando (o un receptor) que se une específicamente a la superficie celular (especialmente un componente de la vía de internalización endosoma-fagosoma) de una o más células presentadoras de antígeno. La molécula de unión específica puede ser un anticuerpo a una molécula de superficie celular, o un derivado del mismo (por ejemplo, Fab, scFv).

La expresión de CD80, CD83 y CD86 puede analizarse por citometría de flujo usando anticuerpos marcados con fluorescencia. Tras el transporte durante la noche, las muestras de sangre se tiñen en una hora desde su recepción. Las técnicas convencionales se utilizan para el análisis de la lisis de glóbulos rojos y análisis de marcadores por citometría de flujo. Las células dendríticas son identificadas basándose en un bajo nivel de expresión de los linfocitos, monocitos y marcadores de células NK junto con una expresión alta de HLA-DR. Las células dendríticas también pueden caracterizarse de acuerdo con la expresión de CD11c y CD123. Los monocitos se identifican mediante análisis de dispersión lateral y la expresión de un marcador de linaje de monocitos. Los análisis de la expresión de CD80, CD83, CD86 se realizan después de la identificación del tipo de célula. Las mediciones de voluntarios sanos sirven como controles que indicarían la distribución normal y los niveles de expresión de los marcadores de células dendríticas maduras tales como CD80, CD83 y CD86.

25 Ejemplos

La síntesis de poli(I) y poli(C₁₂U) monocatenario comenzó con la síntesis enzimática de los polinucleótidos de los materiales de partida mononucleótido respectivos: inosina para el poli(I); citidina (C) y uridina (U) para el poli(C₁₂U). A continuación se usaron etapas de extracción y precipitación repetitivas para eliminar las impurezas residuales. Las soluciones de reacción que contienen los productos se concentraron por ultrafiltración y se extrajeron con fenol cuatro veces. Las soluciones concentradas y extraídas se precipitaron, se disolvieron y se precipitaron de nuevo en etanol acuoso (50:50). Mientras que el poli(I) precipitado se separó por centrifugación, la fase líquida sobrenadante (residuos) del poli(C₁₂U) adherente se eliminó simplemente por aspiración. Las pastas de precipitados se volvieron a disolver, a continuación se concentraron, se diafiltraron y se concentraron de nuevo. Las soluciones a granel finales que contienen polinucleótido se filtraron. La solución filtrada se liofilizó y las materias primas se almacenaron congeladas.

Síntesis enzimática. La síntesis enzimática utilizada en el proceso de fabricación es dependiente de la enzima polinucleótido fosforilasa para sintetizar el ácido polinosínico y policitidílico₁₂uridílico a partir de sus respectivos materiales de partida: citidin 5'-difosfato, sal trisódica (CDP·Na₃), uridin 5'-difosfato, sal disódica (UDP·Na₂) e inosin 5'-difosfato, sal trisódica (IDPNa₃).

La enzima cataliza la formación de polinucleótido en una reacción reversible utilizando Mg⁺⁺ como un co-factor y ATP como fuente de energía. Los polinucleótidos se sintetizaron en la dirección 5' a 3' con la liberación concurrente de fosfato inorgánico. El rendimiento máximo se vio limitado por el equilibrio entre las velocidades de síntesis y reversión, la reacción de degradación (fosforolisis). El progreso de la reacción se siguió midiendo el consumo de CDP o IDP. La viscosidad de la solución de reacción también se controló. Se filtró agua purificada en el tanque. Al tanque se añadieron de una vez los siguientes componentes y se mezcló: TRIS (hidroximetil)aminometano, urea, cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O) y ácido etilendiaminotetraacético (edetato), sal disódica (EDTA·Na₂). También se añadieron materia prima de mononucleótidos.

Cada componente se disolvió antes de añadir el siguiente. Después de que se hubieran añadido todos los componentes, la solución se mezcló durante un mínimo de 10 minutos. A continuación, la mezcla se ajustó y se añadió agua purificada hasta obtener un volumen final del lote. De esta mezcla de reacción pre-enzima se tomaron muestras para determinar la concentración inicial de CDP o IDP. La enzima polinucleótido fosforilasa se añadió mezclando, con lo cual comenzó la síntesis de polinucleótidos. Además, el perfil de viscosidad a la concentración óptima de la enzima debe exhibir el aumento habitual de la viscosidad con el tiempo sin una disminución significativa al término de la reacción de lote; una disminución significativa de la viscosidad indicaría la degradación no deseada de los polinucleótidos. Después de añadida la cantidad optimizada de enzima al lote de producción, la síntesis enzimática progresó con agitación constante y controlada. El consumo de CDP o IDP se controló aproximadamente cada hora. La reacción se terminó mediante la adición de una solución de parada. La viscosidad también se controló, a título informativo, durante el proceso.

Concentración de la solución de reacción. Para reducir al mínimo el volumen requerido de fenol para las extracciones, se concentró la solución del producto de reacción.

Extracción de *Poli(I)* y *Poli(C₁₂U)*. La enzima residual se eliminó predominantemente por extracción con fenol. Las soluciones del producto de reacción poli(C₁₂U) o poli(I) concentradas se transfirieron al tanque de extracción y se añadieron TRIS 2M y dodecilsulfato de sodio (SDS). Después de al menos 5 minutos de mezclado, se añadió fenol licuado y la solución de dos fases se mezcló para dispersar la fase de fenol en la fase acuosa. Se empleó SDS como un agente tensioactivo para facilitar la disolución de la proteína desnaturalizada en la fase fenol; se requirió TRIS para tamponar la solución a un pH óptimo para la estabilidad de los polinucleótidos. La mezcla de extracción permanece sin mezclar durante tiempos de sedimentación predeterminados para que se produzca la coalescencia de las fases. La fase de residuos de fenol inferior se bombea a continuación a los contenedores para su eliminación. La ubicación del corte de fenol era importante con el fin de separar eficazmente el fenol y la proteína de la fase de producto superior, que contiene poli(C₁₂U) o poli(I). La fase de fenol y una capa intermedia de emulsión que contiene sólidos de proteína desnaturalizada, se descartaron observando visualmente el líquido que fluye a través del cristal en la salida del tanque. Cuando la capa de fenol y la capa de emulsión desaparecieron y sólo se observó fase de producto, la válvula de salida se cerró y el corte de fenol se consideró completo.

15 Precipitación de *Poli(C₁₂U)* o *Poli(I)*. El fenol contaminante, SDS y otras sales restantes en la solución se eliminaron por precipitación con alcohol etílico desnaturalizado. La solución de poli(C₁₂U) o poli(I) concentrada se bombeó en el tanque de precipitación. Se añadió el alcohol desnaturalizado y después de mezclar se separó el precipitado.

20 *Concentración y diafiltración.* Las sales a granel restantes, una pequeña cantidad de mononucleótido sin reaccionar y el fenol se eliminaron mediante diafiltración frente a agua. El precipitado se disolvió en el recipiente de precipitación original con mezcla suave y calefacción. Después de disolver, la solución se concentró de nuevo y se diafiltró frente a agua para inyección (WFI). La solución se filtró antes de la liofilización.

25 *Liofilización.* El material poli(C₁₂U) o poli(I) filtrado se cargó en un liofilizador. El material se congeló y a continuación se aplicó un vacío. El producto se consideró liofilizado cuando se completó el ciclo programado.

30 *Fabricación de la solución estéril de Poli(I):Poli(C₁₂U) para infusión intravenosa.* El poli(I) y poli(C₁₂U) se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato. Se mezclaron cantidades molares iguales en una etapa de hibridación y se enfriaron a temperatura ambiente. Las soluciones se filtraron estérilmente.

35 *Preparación de la solución con excipiente, vehículo tampón.* Se añadió WFI al tanque. Los excipientes se añadieron al tanque y se mezclaron. Después de mezclar, se tomaron muestras del lote para determinar el pH y la osmolalidad. El control de calidad debe estar dentro de los límites durante el proceso antes de su uso para la formulación de las soluciones que contienen poli(I) y poli(C₁₂U).

40 *Formulación de las soluciones de Poli(I) y Poli(C₁₂U).* Una cantidad inicial de solución de tampón se subdividió según la fórmula del lote y se filtró y se añadió al tanque. El poli(I) o poli(C₁₂U) se añadió a la solución tampón y se disolvió mezclando. La temperatura de la solución se aumentó y se mantuvo con mezclado. La solución se recirculó a continuación.

45 *Hibridación de las cadenas de Poli I y Poli₁₂U.* Se transfirieron al tanque cantidades equivalentes de poli(I) y poli(C₁₂U). Con mezclado continuo, se aumentó la temperatura de la solución. Se extrajeron muestras y se analizaron para determinar la potencia y el pH.

45 *Filtración estéril.* La solución a granel se filtró estérilmente en línea en un recipiente de compensación esterilizado al vapor.

50 *Operaciones de llenado.* Se llevó a cabo la operación de llenado. Después de llenado cada vial, se usó un tapón estéril para tapar el vial. Los viales con tapón fueron transportados desde el área de procesamiento aséptico donde fueron sellados.

55 El ARNdc robusto se aisló del poli(I):poli(C₁₂U) hibridado, que se preparó de acuerdo con lo anterior, ya sea por cromatografía analítica o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) preparativa como una molécula sustancialmente purificada y farmacéuticamente activa. Su peso molecular es de aproximadamente 286 kDa y tiene aproximadamente 413 pares de bases de longitud con aproximadamente 34 vueltas completas de la hélice de ARN. Sólo es de aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 4 % en moles de una composición no fraccionada de AMPLIGEN® (rintatolimod). La mayoría del ARNdc (alrededor de 96 % en moles a aproximadamente 99 % en moles) después de la síntesis tiene un peso molecular de aproximadamente 1,2 Mda y tiene una longitud de aproximadamente 2.000 pares de bases con aproximadamente 166 vueltas completas de la hélice de ARN. El ARNdc robusto en el pico de HPLC 5 min es aproximadamente 4,9 veces más pequeño que la mayor parte del ARNdc y encaja mejor con el sitio de unión al ligando de su receptor de superficie celular (TLR33).

65 Debido a su estructura, el ARNdc robusto es inusualmente resistente a la interrupción de su ARN de doble hélice y desplegado molecular. Por lo tanto, el ARNdc robusto en las condiciones de ensayo descritas en la presente memoria tiene aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 veces mayor de bioactividad que el mismo peso de AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) no seleccionado.

(a) Protección por poli(I):poli(C₁₂U) mediante la activación selectiva de TLR3

La activación de TLR3 está asociada a la expresión de IFN- α/β , IL-6 o IL-12. La relación entre la expresión de IFN a través de la activación de TLR3 por el ARNdc fue establecida por Alexopoulou (2001) utilizando células 293T que expresan diferentes receptores de tipo toll (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 o TLR9 humano). Sólo aquellas células que contienen TLR3 humano mostraron una expresión marcada de IFN- α/β , IL-6 o IL-12 cuando se estimulaban con poli(I):poli(C).

Poli(I):poli(C₁₂U) Induce la modulación del gen de defensa del hospedador a través de una activación de TLR3 muy selectiva. Para entender la relación entre la respuesta inmunitaria innata dependiente de TLR3 y la protección viral, Gowen (2007), sometió a ratones deficientes en TLR3 a ARNdc y midió la expresión de IFN- α/β , IL-6 e IL-12. Los ratones también fueron posteriormente estimulados por exposición al virus de Punta Toro (PTV). La protección contra la estimulación viral era exquisitamente sensible al tratamiento con poli(I):poli(C₁₂U). La protección viral conferida por poli(I):poli(C₁₂U) estaba completamente abolida en el caso de los ratones deficientes de TLR3. Cuando se compara con la eficacia parcial pero significativa de poli(I):poli(C) en ratones TLR3^{-/-}, está claro que las sustituciones estructurales de la uridina en la cadena de citidina de poli(I):poli(C₁₂U) son responsables de la vía dependiente de TLR3 altamente específica. Además, las mediciones de IFN- α/β e IL-6 establecen una asociación directa entre la protección o la falta de la misma frente al PTV y la modulación de estas citocinas.

Esta orientación selectiva de la vía de señalización de TLR3 representa una ventaja significativa para las aplicaciones terapéuticas de poli(I):poli(C₁₂U) en comparación con otros posibles mecanismos citosólicos tales como, por ejemplo, el uso de poli(I):poli(C) en el ARNdc no sustituido para estimular la producción de citocinas a través de ARN helicinas tales como MDA-5 y RIG-1 (Pichlmair, 2006).

(b) La unión del ARNdc a TLR3 requiere la conformación helicoidal del ARNdc

Sitio de unión a TLR3. Al estudiar la estructura de los cristales nativos de TLR3, Choe (2005) observó que TLR3 es una estructura grande solenoide, dextrógiro, en forma de herradura formada por 23 repeticiones ricas en leucina. La superficie convexa glicosilada y las superficies cóncavas cargadas negativamente son sitios poco probables para la unión del ARNdc. En consecuencia, propusieron que la unión del ARNdc se produce en áreas cargadas positivamente, situadas en la cara lateral.

Utilizando el análisis mutacional, Bell (2005, 2006) modificaron presuntos sitios de unión a TLR3 en las áreas cargadas positivamente y observaron la formación de un complejo ARNdc/TLR3 por cromatografía de exclusión por tamaño. A pesar de la presencia de numerosos residuos cargados positivamente, sólo se requerían para la unión dos aminoácidos N541 y H539. El grupo amido de H539 podría interactuar con el ARNdc mediante un enlace de hidrógeno. La proximidad del segundo residuo cargado positivamente N541 también era importante, aunque el papel de este aminoácido no era tan claro. La mutación en el aspirado cargado negativamente evitaba la unión del ARNdc, sin embargo la conversión en un residuo de alanina neutro no tuvo ningún efecto sobre la unión del ARNdc.

La unión a TLR3 requiere la conformación helicoidal del ARNdc. Tras la determinación estructural de las superficies de unión más probables del ARNdc en TLR3, Choe (2005) propuso, además, que la simetría helicoidal de la estructura del ARNdc es necesaria para la creación de la forma activada de dímero simétrico de TLR3 asociado a la membrana. En el complejo ternario en la superficie de la membrana, dos moléculas de TLR3 simétricamente opuestas se unen a cada lado de la hélice de la ARNdc común.

Como se discutió anteriormente, utilizando el análisis mutacional, Bell (2005, 2006) definió dos residuos altamente conservados (N541 y H539) que son necesarios para la unión del ARNdc a TLR3. Además, el requisito de restricción para la unión del ligando a ambos de estos residuos de TLR3 se satisface sólo por la arquitectura del surco menor de la conformación (helicoidal) del ARNdc. Cuando el fosfato del ARNdc se une en las proximidades a H539 sensible a la carga, entonces el lado amida (H541) se alinea con el sitio de unión al hidrógeno de un grupo 2'-hidroxilo del ARNdc sólo cuando se utilizan dimensiones helicoidales.

(c) La conformación helicoidal del ARNdc y la consiguiente alteración debida a las interacciones con el ligando se caracterizan con precisión mediante dicróismo circular

El dicróismo circular proporciona información detallada acerca de las estructuras helicoidales secundarias del ARNdc o sus alteraciones debidas a la unión al ligando; así como los cambios estructurales causados por la hidrólisis enzimática y la adición de iones metálicos. Además, en el modo de estrés térmico, la información conformacional ofrecida por el DC proporciona información valiosa para explicar la estabilidad del ARN.

Caracterización del ARNdc. Gray (1995) mostró que el DC, aplicado en el protocolo de la curva de mezcla, coimplementaba mediciones de absorción ultravioleta para determinar la estequiometría del ARN bicatenario (A-G:C-T(U)). En este enfoque, la propiedad óptica se analiza como una función de las proporciones añadidas de cadenas individuales. Las magnitudes de las gráficas de diferencia del DC eran máximas para las mezclas 50:50. Además, el comportamiento isodicroico se correlacionaba con la formación de estructuras más ordenadas o

intracadenas.

Interacciones con el ligando. Ghazaryan (2006) estudió la interacción del ligando con el ARNdc con una familia de piridinio porfirinas cargadas positivamente. A partir de las mediciones de DC observaron que pequeñas modificaciones de la estructura de porfirina conducían a profundas diferencias en el modo de su unión a la estructura de doble hélice. Mientras que T_{Et}OHPyP4 se asociaban por intercalación, T_{Met}AlPyP4 se unía formando una estructura externa de auto-apilamiento.

Usando el dicroísmo circular, Brown (2002) mostró que ADAR1, un ARNdc humano (quimérico) se convertía de la forma A a la forma Z α tras la unión a adenosina desaminasa. La corroboración se obtuvo por cristalización del complejo y espectroscopia de Raman. Sorrentino (2003) estudió la potente degradación enzimática del ARNdc por la ribonucleasa pancreática humana (HP-RNasa). El dicroísmo circular del complejo ARN/enzima reveló que la unión multi-sitio del ARNdc a la HP-RNasa era responsable de la desestabilización de la hélice de ARN.

Estabilidad de ARNdc. Al estudiar el componente ARNr del complejo ribosomal 70S, Sumita (2005) mostró que las sustituciones de pseudouridina estabilizan la hélice del ARNdc basándose en la información estructural proporcionada por dicroísmo circular (DC). Específicamente, las sustituciones de pseudouridina creaban regiones bicatenarias con pares de bases de cierre y enlaces de hidrógeno mediados por agua. La estabilización mediante Mg⁺⁺ también se caracterizó por DC en este estudio. Investigando la estabilidad de los híbridos de ADN-ARN con variantes en la composición de bases, Lesnik (1995) mostró que los híbridos más estables conservan la elipticidad a 210 nm, una longitud de onda característica de la banda de ARN de un solo componente (forma híbrida A). Por el contrario, híbridos menos estables mostraban menor elipticidad a 210 nm, valores que fueron intermedios entre los componentes de ARN y ADN.

Una composición de ARNdc puede ser analizada por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) como se muestra en la Fig. 1. El análisis de un lote representativo de AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) dio como resultado dos picos distintos: uno con tiempos de retención de 9,85 a 10,35 min que corresponde a la cadena de poli(I) y de 7,30 a 7,80 min, lo que corresponde a la cadena de poli(C₁₂U). El ARNdc robusto se encuentra en un tiempo de retención de aproximadamente 5 min, lo que representa una especie molecular única resistente a la desnaturalización y al desplegado. Las condiciones desnaturalizantes eliminarían la actividad biológica exclusivamente debida a la unión al receptor TLR3. Este método analítico puede usarse también como un ensayo que indica la estabilidad y, en particular, puede ser utilizado para mostrar que el ARNdc robusto es inusualmente resistente a la interrupción de su doble hélice y al despliegue molecular.

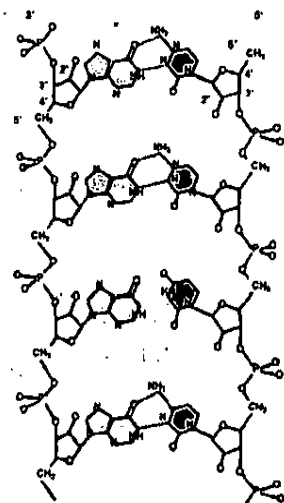
La identidad de cada pico se determina por análisis con un detector de matriz de fotodiodos (MFD) como se muestra en la Fig. 2. En cada tiempo de retención seleccionado, se obtuvo una exploración de absorción UV de longitudes de onda de 200 nm a 360 nm. El dúplex poli(I):poli(C₁₂U) y las cadenas individuales de poli(I) y poli(C₁₂U) tienen sus propias longitudes de onda de absorción pico específicos. Los picos de absorción centrados en 248 nm y 265 nm indican la presencia de ARNdc robusto (alrededor de 286.000 dalton) que tiene poli(I) y poli(C₁₂U), respectivamente (Fig. 2A). El pico de absorción centrado en aproximadamente 265 nm indica la presencia de la cadena poli(C₁₂U) (Fig. 2B). El pico de absorción centrado en aproximadamente 248 nm indica la presencia de la cadena poli(I) (Fig. 2C). El pico de absorción centrado en aproximadamente 230 nm se debe al acetonitrilo utilizado como disolvente. Debido a la escasez relativa de ARNdc robusto, la señal a 230 nm se restó de la Fig. 2A.

Nombre común: poli(I):poli(C₁₂U) especie predominante

Nombre químico: poli(ácido inosínico):poli((ácido citidílico)₁₂(ácido uridílico))

CAS, número de registro: 3864-92-5

Otros nombres: YY057



Peso molecular

1.100.000 da

Arriba se muestran una vista parcial de las cadenas de poli(I):poli(C₁₂U) parcialmente hibridadas y la interacción de bases de las cadenas individuales de poli(I) y poli(C₁₂U). Bases individuales de inosina se unen a bases de citosina, pero no a la base uridina. En esta estructura, el poli(ácido inosínico) está unido a través del hidrógeno (líneas discontinuas) al poli(ácido citidílico), ocurriendo la sustitución de ácido uridílico cada 12-13 bases como promedio.

5 Fórmula molecular: (13C₁₀H₁₁N₄O₇P)_n: ((12C₉H₁₂N₃O₇P)(C₉H₁₁N₂O₈P))_n

Tamaño molecular: aproximadamente 1.200.000 daltons

El número de unidades de repetición (n) correspondientes al tamaño de poli(I):poli(C₁₂U) de aproximadamente 1,2 Mda es 2000 pares de bases o 166 vueltas helicoidales completas.

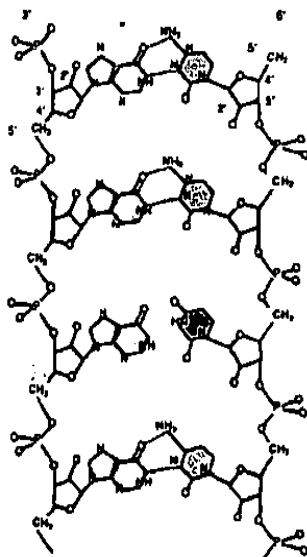
10

TABLA 2. Peso molecular (PM) de los componentes

| | PM | Unidad de repetición | PM de unidad de repetición |
|------------------------|---------------|----------------------|----------------------------|
| Inosin 5' monofosfato | 330 | 13 | 4527 |
| Citidin 3' monofosfato | 305 | 12 | 3880 |
| Ácido uridílico | 306 | 1 | 324 |
| Global | Promedio: 318 | N/A | Suma: 8730 |

Nombre común: poli(I):poli(C₁₂U) especie menor variante (286.000 daltons)

Nombre químico: poli(ácido inosínico):poli((ácido citidílico)₁₂(ácido uridílico))



Peso molecular
286.000 da

15

Arriba se muestra una vista parcial de las cadenas parcialmente hibridadas de poli(I):poli(C₁₂U) y la interacción de bases de las cadenas individuales de poli(I) y poli(C₁₂U). Las bases individuales de inosina se unen a bases de citosina, pero no a la base de uridina. En esta estructura, el poli(ácido inosínico) está unido a través del hidrógeno (líneas discontinuas) al poli(ácido citidílico), ocurriendo la sustitución de ácido uridílico cada 12-13 bases como promedio. Este es el ARNdc "robusto".

20

Fórmula molecular: (13C₁₀H₁₁N₄O₇P)_n: ((12C₉H₁₂N₃O₇P)(C₉H₁₁N₂O₈P))_n

Tamaño molecular: aproximadamente 286.000 daltons

25

El número de unidades de repetición (n) correspondiente al intervalo de tamaño de la nueva variante, también denominado ARNdc robusto (también denominado pico de 5 min en la HPLC) es de 286 Kda teniendo 413 pares de bases, lo que representa 34 vueltas completas de la hélice de ARN y es resistente al desensamblaje de las cadenas unidas a través del hidrógeno en condiciones de temperatura elevada o iónicas anormales.

30

El dicroísmo circular (DC) se ha utilizado para medir la estructura secundaria (hélices bicatenarias) de polímeros biológicos y sintéticos, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos. El DC es la medición de la absorción de la luz polarizada circular a derecha o izquierda, a una longitud de onda específica, por moléculas quirales. La quiralidad química es la propiedad de una molécula de ser o no ser superponible sobre su imagen especular. Un átomo que hace que su molécula sea quiral se llama un átomo quiral o, más comúnmente, un centro quiral. El poli(I):poli(C₁₂U)

35

tiene una serie de centros quirales debido a sus estructuras primarias y secundarias. Los centros quirales se encuentran en las bases de nucleótidos, que forman las dos estructuras primarias de las dos cadenas de ARN individuales (ARN monocatenario) de poli(I):poli(C₁₂U). Los centros quirales adicionales proceden de la hibridación de cada ARN monocatenario con el otro a través de enlaces de hidrógeno de sus bases complementarias. La unión hidrófoba entre las bases adyacentes de ARNdc se conoce como apilamiento de bases y produce una estructura

secundaria helicoidal, flexible, lineal simétrica de forma y tamaño definidos. Los espectros de DC para AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U), que es dependiente de la longitud de onda, se observa que es una función que refleja la absorción de Gauss para cada centro quiral. Para ello, el espectro de DC de un ARNdc tal como poli(I):poli(C₁₂U) es dependiente del apareamiento de bases complementarias de las estructuras de doble cadena y el complejo de quiralidad de la estructura helicoidal resultante.

Se ha demostrado por espectroscopia UV y DC que la actividad biológica del ARNdc es dependiente de estas configuraciones espaciales y estéricas específicas. Dado que la perturbación de la estructura helicoidal tiene como resultado la pérdida de los centros quirales característicos de la estructura secundaria, el análisis y la monitorización de la estructura secundaria por DC proporciona un método para caracterizar las propiedades fisicoquímicas del poli(I):poli(C₁₂U) que están asociados con su bioactividad.

La elipticidad específica medida en un barrido de longitud de onda proporciona un parámetro cuantitativo, que se calcula como la relación de elipticidad en ciertas longitudes de onda "críticas". El valor de este parámetro estructural, la relación DC₂₇₈/DC₂₄₅, es única para el poli(I):poli(C₁₂U). En un segundo análisis de DC, la elipticidad se mide durante el calentamiento. A medida que el poli(I):poli(C₁₂U) se calienta y se desnaturaliza térmicamente, las cadenas de poli(I) y poli(C₁₂U) individuales se desenrollan debido a la ruptura de enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Cuando se representa la derivada de la temperatura de elipticidad, el valor mínimo derivado corresponde a la temperatura de fusión, definido como el punto en el que se desenrolla el 50 % de la conformación de doble cadena. La anchura a media altura del pico, una medida de la uniformidad estructural, también se convierte en una indicación de su integridad. En conjunto, estos índices térmicos proporcionan una medida de la resistencia de las hélices de ARNdc.

La exploración de longitud de onda detecta dos picos: un primer pico a 245 nm correspondiente a la hélice de cadena doble del poli(I):poli(C₁₂U) y un segundo pico a 278 nm que corresponde al apilamiento de pares de bases del ácido nucleico.

Precisión. AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U), lote 9807CD, a una concentración de 2,5 mg/ml se sometió a ensayo varias veces para investigar la precisión del ensayo de DC. Las desviaciones estándar relativas porcentuales (% DER) para la temperatura de fusión (T_M), para la anchura a media altura para la primera derivada de la curva de fusión y para la relación entre las mediciones de los picos de DC a 278 nm y 245 nm se calcularon como 0,76 %, 9,09 % y 1,41 %, respectivamente. Esto demostró que el ensayo de DC de AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) actúa de una manera precisa durante el análisis térmico para la determinación de T_M y la anchura a media altura de la primera derivada de la curva de fusión térmica y durante el análisis de exploración de DC para la determinación de la relación de DC a 278 no a DC a 245 nm.

Especificidad. Este método de DC para la caracterización de poli(I):poli(C₁₂U) también es específico, ya que puede diferenciar entre ácidos nucleicos de doble cadena de ácidos nucleicos de una cadena sencilla u otros ácidos nucleicos de doble cadena similares que no cumplen con las especificaciones de fabricación y liberación de AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U). La especificidad de este método, en lo que respecta al análisis de ácidos nucleicos de una cadena frente a los de doble cadena, se demostró mediante la comparación de los perfiles de exploración y curvas de temperatura de fusión. Las exploraciones de moléculas de doble cadena, tales como poli(I):poli(C₁₂U); poli(I):poli(C) y poli(A):poli(U) difieren significativamente de las obtenidas durante el análisis de moléculas de una cadena sencilla tales como poli(I) y poli(C₁₂U). Además, cada una de las exploraciones de DC fue única para las especies moleculares que se ensayaron.

La especificidad del ensayo también se investigó para evaluar, de forma inequívoca, la capacidad de detectar compuestos de estructura estrechamente relacionada.

- (a) Ácidos ribonucleicos de doble cadena de diferente composición de bases de nucleótidos, tales como poli(I):poli(C₁₂U), poli(I):poli(C) y poli(A):poli(U).
- (b) AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) que cumpla con la especificación de tamaño del polímero.
- (c) Ácido ribonucleico de doble cadena formulado a partir de las cadenas de poli(I) y poli(C_xU_y) con una relación entre bases de citidina y uridina de 11-14 a 1 (relación C:U = 11:1 a 14:1).

La especificidad de los ensayos para el ARNdc que difería en su composición de bases de nucleótidos se puso de manifiesto por comparación de las exploraciones de DC y las curvas de fusión de moléculas de doble cadena, similares, pero diferentes, tales como poli(I):poli(C₁₂U), poli(I):poli(C) y poli(A):poli(U). Los perfiles de la exploración de DC parecen ser similares, como se ha visto con las exploraciones de AMPLIGEN® poli(I):poli(C₁₂U) y poli(I):poli(C). Pero los cálculos de las relaciones obtenidas a 278 nm y 245 nm y el análisis estadístico con la prueba t posterior para la igualdad de las medias, mostraron que la exploración de DC de AMPLIGEN® (rintatolimod) difiere significativamente del ARNdc similar que tiene diferentes composiciones de bases de nucleótidos. La especificidad para el ARNdc de diferente composición de bases de ácido nucleico también se demostró por sus curvas de fusión térmica. Las curvas de fusión térmica del ARNdc diferían significativamente entre sí. El análisis estadístico (prueba t para medias iguales) de los datos de las gráficas de la primera derivada de las curvas de fusión confirmó que los resultados obtenidos para sus respectivas T_M y la anchura a media altura son significativamente diferentes. Por lo

tanto, la especificidad del método de DC diferencia AMPLIGEN® (rintatolimod) de otras moléculas de ARNdc por parámetros tanto de la exploración como de los perfiles de fusión térmica.

5 El método de DC es específico para la detección de poli(I):poli(C₁₂U) formulado a partir de polímeros que no cumplan con las especificaciones antes mencionadas para el tamaño. Cuando uno o ambos polímeros de la molécula de poli(I):poli(C₁₂U) está fuera de la especificación de tamaño 4-8S, los resultados del análisis de DC de estas moléculas no cumplen con las especificaciones de AMPLIGEN® (rintatolimod) en lo que respecta a T_M y a la anchura a media altura de la primera derivada de la curva de fusión térmica. El no cumplimiento con las especificaciones de estos parámetros de DC se observa con estas formulaciones, incluso cuando se satisface la especificación de tamaño diferencial $\pm 1,5S$. En relación con los datos obtenidos de los análisis de fusión térmica de las formulaciones de AMPLIGEN® (rintatolimod), las determinaciones de la relación DC₂₇₈/DC₂₄₅ eran menos específicas. Las exploraciones de DC por sí solas no diferencian entre las formulaciones de poli(I):poli(C₁₂U) y no-poli(I):(C₁₂U) que no cumplieran con las especificaciones de fabricación y/o liberación para el tamaño del polímero.

15 Como se indicó anteriormente, la especificidad del análisis de DC es sensible al tamaño de las cadenas de polímero de una cadena sencilla. Además, cuando la diferencia de tamaño entre los componentes complementarios del polímero de una cadena sencilla, poli(I) y poli(C₁₂U), es 2,4S o mayor, el análisis de fusión térmica por DC va a diferenciar poli(I):poli(C₁₂U) a partir de moléculas similares que no cumplen con la especificación para la diferencia en el tamaño del polímero complementario.

20 El análisis de DC puede distinguir entre poli(I):poli(C₁₂U) y moléculas similares que no cumplen con las especificaciones de la cantidad de estructura de doble cadena ni con el apareamiento de bases entre las cadenas poli(I) y poli(C₁₂U) complementarias. La cantidad de apareamiento de bases es dependiente de la proporción relativa entre ácido citidílico y ácido uridílico (relación C:U) del polímero (C_xU_y). La relación entre citidina y uridina en el polímero (C_xU_y) afecta a la temperatura de fusión, (T_M), así como a la anchura a media altura de la primera derivada de la curva de fusión. Cuando la relación entre citidina y uridina es inferior a 11:1, hay menos cantidad de estructura de doble cadena o apareamiento de bases (entre las cadenas complementarias de ácido poliinosínico y ácido policitidílico de la hélice de ARN bicatenario) que la de AMPLIGEN® (rintatolimod). Esto se traduce en T_M observadas menores y anchuras más grandes a media altura para la primera derivada de las curvas de fusión térmica respecto a lo observado para poli(I):poli(C₁₂U). El aumento de la relación entre citidina y uridina de la cadena poli(C_xU_y) aumenta el apareamiento de bases entre las cadenas complementarias de la hélice y, por lo tanto, aumenta la T_M observada y disminuye el ancho observado a media altura de la primera derivada de la curva térmica. Las determinaciones DC₂₇₈/DC₂₄₅ resultaron ser menos sensibles a las diferencias en la relación C:U en las formulaciones de AMPLIGEN® (rintatolimod).

35 Tanto el tamaño de las cadenas complementarias de polímero como la relación C:U de la cadena del poli(C₁₂U) doble contribuyen a la estructura de doble cadena de una molécula de poli(I):poli(C₁₂U). La estructura de doble cadena, a su vez, contribuye a la eficacia del fármaco, como se ha discutido en la introducción. Por lo tanto, el método de DC es una herramienta analítica importante para la caracterización de poli(I):poli(C₁₂U). Aunque las exploraciones de DC y las determinaciones DC₂₇₈/DC₂₄₅ son menos específicas que las determinaciones del análisis de fusión térmica de T_M y la anchura a media altura de la primera derivada de la curva de fusión, los tres parámetros de DC se pueden utilizar en combinación para la caracterización e identificación exhaustiva de poli(I):poli(C₁₂U):

Bioactividad y estabilidad de del ARNdc robusto

45 Se midió la bioactividad del ARNdc y del poli(I):poli(C₁₂U) y, a continuación, se compararon utilizando un ensayo de unión a ligando. La estabilidad se midió usando el ensayo de liberación de producto, ensayo de HPLC de fase inversa.

50 A continuación se presenta un resumen de los resultados, seguido de una discusión más detallada. La combinación de una mayor bioactividad y una estabilidad mucho mayor en condiciones de estrés térmico de 40 °C ilustran la "robustez" de esta novedosa variante de ARNdc (es decir, ARNdc robusto) y sugieren que estará más biodisponible que la mayoría de las moléculas de ARNdc en una formulación de AMPLIGEN® (rintatolimod).

55 1. Bioactividad del ARNdc robusto que muestra dos veces mayor afinidad de unión en comparación con el ARNdc no seleccionado.

60 Los sitios de unión al ARNdc robusto se convierten en insaturados en una proporción de 0,50:1 (TLR3:ARNdc robusto) o superior. Pero los sitios de unión para AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) se convierten en insaturados en una proporción de 0,20: 1 (TLR3:ARNdc no seleccionado) o superior.

2. La estabilidad del ARNdc robusto es cuatro veces mayor que la del ARNdc no seleccionado

65 AMPLIGEN® (rintatolimod) poli(I):poli(C₁₂U) es estable (es decir, S_{w,20} > 10,0) durante menos de 90 días cuando se somete a hidrólisis bajo estrés térmico de 40 °C. Por el contrario, el ARNdc robusto es estable durante más de 360 días en las mismas condiciones.

3. Los datos de estabilidad y bioactividad muestran que el ARNdc robusto está más biodisponible que el ARNdc no seleccionado

5 A partir de estas consideraciones de estabilidad y bioactividad, el ARNdc robusto está más biodisponible para el receptor de señalización relevante que transmite el beneficio terapéutico. El ARNdc robusto tiene el beneficio adicional de mantener la estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente, lo que tiene importantes implicaciones clínicas para el tratamiento de las poblaciones en las regiones del mundo sin las capacidades de refrigeración adecuadas.

10 Bioactividad de fondo

15 Los receptores tipo toll (TLR) son moléculas de señalización que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) y activan los mecanismos de la defensa inmunitaria innata: TLR3 reconoce el ARNdc, la estructura genómica de algunos virus, y también un intermedio generado durante la replicación del ARN viral. El ARNdc también se produce intracelularmente mediante la formación de una estructura de tipo tallo-bucle o con ARNsi-ARNm. AMPLIGEN® (rintatolimod) está compuesto de moléculas de ARNdc que actúan a través de la unión de TLR3 y en procesos de señalización de etapas posteriores. Aunque la señalización de poli(I):poli(C) tiene rutas alternativas, la vía del poli(I):poli(C₁₂U) actúa exclusivamente a través de la unión a TLR3, ya que el tratamiento con AMPLIGEN® (rintatolimod) protege a los ratones TLR3^{+/+} pero no TLR3^{-/-} de la infección por el virus Punta Toro. Las células TLR3^{-/-} no producen IFN tras el tratamiento con poli(I):poli(C₁₂U), mientras que el IFN es inducido por el poli(I):poli(C) en las células con TLR3 desactivado.

20 La conformación del ectodominio (ECD) de la molécula TLR3 y su relación con la unión de ARNdc está bien caracterizada, incluyendo el potencial sitio de unión. Los aminoácidos H539 y N541 están implicados en la interacción con la doble hélice. El análisis mutacional de estos aminoácidos en el sitio de unión refuerza aún más el argumento.

25 Se conoce el efecto de la longitud y la estructura de ARNdc sobre la unión a TLR3 y la inducción de IFN. La inosina₃₀(I₃₀):poli(C) o poli(I):citosina₃₀(C₃₀) indujo el interferón (IFN), pero tramos más cortos de ARNdc no inducen IFN. Sin embargo, en comparación con ellos, la inducción de IFN por poli(I):poli(C) era siempre superior. I₂₀:C₂₀, I₃₀:C₃₀ e I₄₀:C₄₀ eran inductores de IFN ineficaces. Por lo tanto, la caracterización de AMPLIGEN® (rintatolimod) por su capacidad de unión a TLR3 es un biomarcador para predecir su actividad biológica.

35 Método de bioactividad

40 Un intervalo de relaciones entre TLR3-ECD y AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado o ARNdc robusto se hacen reaccionar por el método de Leonard (2008). Los componentes se separan mediante el método de cromatografía de exclusión por tamaño descrito a continuación. A partir de las cantidades máximas de TLR3-ECD libre y del complejo ligando-receptor, se determina la relación de TLR3-ECD que se requiere para la saturación de cualquiera de AMPLIGEN® (rintatolimod) o ARNdc robusto. Esta relación TLR3-ECD/ARNdc umbral proporciona una indicación directa de la fuerza ligando-unión del ligando y, por tanto, de la bioactividad.

45 El siguiente método es una adaptación de los procedimientos experimentales utilizados para caracterizar la unión al ligando TLR3 a nivel molecular. Dado que TLR3-ECD (1,12 x 10² Kda) y poli(I):poli(C₁₂U) (0,2-2 x 10³ Kda) tienen diferentes patrones de elución, pueden ser separados unos de otros por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del poli(I):poli(C) utilizando una columna SUPERDEX 200 PC 3.2/30 y recogiendo fracciones de 80 µl, la mayoría del poli(I):poli(C) aparece en las fracciones 3-5, mientras que TLR3-ECD se eluye en las fracciones 9-12 (Bell, 2005).

50 La unión de TLR3-ECD a poli(I):poli(C) o poli(I):poli(C₁₂U) crea un complejo que es más grande de tamaño que cualquiera de los componentes iniciales. La elución posterior de TLR3-ECD libre se separa del complejo. La optimización de la separación identificó que la columna SUPEROSE 200 PC proporcionaba una unión superior mediante la reducción del efecto de cola, debido a la ausencia de interacciones no específicas con el ARNdc.

55 La Fig. 3 muestra los cromatogramas resultantes obtenidos a partir de la mezcla reaccionada de TLR3-ECD/poli(I):poli(C₁₂U) en comparación con las inyecciones de los componentes de TLR3-ECD y poli(I):poli(C₁₂U) solos, respectivamente.

60 *Caracterización de los picos.* La identificación y cuantificación de TLR3-ECD en fracciones de cromatografía de exclusión por tamaño es posible en un formato ELISA. El TLR3-ECD comercialmente disponible es una proteína recombinante que contiene una cola de His. Un anticuerpo de captura anti-cola de His inmoviliza TLR3-ECD en un pocillo de la microplaca. Un segundo anticuerpo primario, biotinilado se une cuantitativamente al TLR3-ECD inmovilizado. Este anticuerpo secundario se selecciona para que tenga un epítipo distal respecto al sitio de unión al ARNdc en la molécula de TLR3-ECD y también respecto al epítipo reconocido por el anticuerpo de captura. La estreptavidina conjugada con HRP reconoce el segundo anticuerpo primario biotinilado. El sustrato apropiado metabolizado por HRP produce un color soluble adecuado para la medición cuantitativa de TLR3-ECD.

La concentración de AMPLIGEN® (rintatolimod) en las fracciones de cromatografía de exclusión por tamaño se mide por fluorescencia utilizando diluciones estándar y fracciones de cromatografía en una prueba de RiboGreen cuantitativa. Este ensayo permite el análisis de AMPLIGEN® (rintatolimod) fuera de su envase (es decir, el ARNdc robusto no seleccionado) sin transformación, preparación o extracción adicional, manteniendo así su condición como producto farmacéutico.

Resultados de bioactividad. Los resultados de la Tabla 3 muestran el porcentaje de TLR3-ECD libre que permanece en una serie de reacciones usando diferentes proporciones entre TLR3-ECD y ARNdc: Estos estudios se realizaron con cualquier AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado, así como ARNdc robusto.

La unión de TLR3-ECD al ARNdc robusto es más eficaz que la unión del TLR3-ECD a AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado. Se requiere una relación aproximadamente 2 veces mayor entre TLR3-ECD y el ARNdc robusto "insaturado" (- 0: 50:1) en comparación con AMPLIGEN® (rintatolimod) (0,25:1). Además, el perfil de unión con varias relaciones muestra un punto final mucho más agudo para la saturación para el caso del ARNdc robusto, lo cual puede reflejar una mayor uniformidad estructural para este ARNdc más compacto.

TABLA 3. Mediciones de bioactividad del ARNdc no seleccionado frente al ARNdc robusto

| Relación molar TLR3 - ARNdc | AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado, Lote nº 0701 HE | | ARNdc robusto | |
|--------------------------------|--|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | % Área del complejo ARNdc/TLR3 | % Área TLR3 libre | % Área del complejo ARNdc/TLR3 | % Área TLR3 libre |
| 0,20: 1 | 99,0 | 0,978 | 99,4 | 0,577 |
| 0,25: 1 | 78,4 | 21,6 | 99,1 | 0,880 |
| 0,33: 1 | 20,9 | 79,1 | 92,9 | 7,086 |
| 0,50: 1 | 58,9 | 41,1 | 60,3 | 39,723 |
| 0,67: 1 | 15,4 | 84,6 | 11,3 | 88,660 |

La unión a TLR3 del ARNdc robusto es 2 veces mejor que la unión al receptor de AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado. TLR3 libre (área > 10 %) aparece en una relación TLR3:ARNdc de 0,25:1 para AMPLIGEN® (rintatolimod) no seleccionado en comparación con un 0,50:1 para el ARNdc robusto.

Estabilidad del ARNdc robusto. La estabilidad del poli(I):poli(C₁₂U) se midió en unas condiciones de temperatura aceleradas de 40 °C en comparación con la temperatura de conservación a largo plazo de 2 °C a 8 °C. Como se muestra en la Fig. 5, el tamaño de poli(I):poli(C₁₂U) decae a esta temperatura según se mide por ultracentrifugación analítica (S_{20,w}). La disminución en el tamaño se debe al despliegue de la doble hélice (pérdida de enlaces de hidrógeno) y a la hidrólisis concomitante de los enlaces fosfodiéster. La bioactividad del ARNdc requiere un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 15,0 S_(20,w), mientras que el tamaño de poli(I):poli(C₁₂U) después de más de 180 días indica una pérdida de bioactividad en alrededor de 8,0 S_(20,w).

La Fig. 6 muestra los resultados de un segundo parámetro indicador de la estabilidad, el ensayo de HPLC de fase inversa, descrito anteriormente, que separa poli(I):poli(C₁₂U) en sus cadenas individuales; es claramente evidente que la hidrólisis comienza con la cadena de poli(I) seguido de la cadena de poli(C₁₂U). Los resultados de HPLC muestran que la pérdida de tamaño no comienza hasta el inicio de la hidrólisis de la segunda cadena de poli(C₁₂U); la molécula de ARN conserva la estructura de doble cadena cuando sólo una de las hebras sufre hidrólisis. Esta pérdida de tamaño en alrededor de 90 días se produce con la hidrólisis tanto de la cadena poli(I) como de poli(C₁₂U).

Es importante destacar que el pico del ARNdc robusto (5 min) no se ve afectado en ningún grado por el estrés térmico. De hecho, aumenta en relación con las cadenas de poli(I) y poli(C₁₂U). Esto muestra de forma concluyente que el ARNdc robusto no sólo es "robusto", sino que puede formarse espontáneamente a partir de cadenas más pequeñas de poli(I):poli(C₁₂U) degradado.

Al indicar un intervalo numérico, se deberá entender que también se describen todos los valores dentro del intervalo (por ejemplo, de uno a diez también incluye todo valor entero entre uno y diez, así como todos los intervalos intermedios, tales como dos a diez, uno a cinco y tres a ocho). El término "aproximadamente" puede referirse a la incertidumbre estadística asociada con una medición o a la variabilidad de una cantidad numérica que una persona experta en la técnica entendería no afecta al funcionamiento de la invención o su patentabilidad.

Todas las modificaciones y sustituciones que se incluyan dentro del significado de las reivindicaciones y el intervalo de sus equivalentes legales están abarcadas dentro de su alcance. Una reivindicación que rece "comprende" permite la inclusión de otros elementos que estén dentro del alcance de la reivindicación; la invención también se describe mediante tales reivindicaciones en las que se citan frases de transición "consiste esencialmente en" (es decir, que permite la inclusión de otros elementos para que estén dentro del alcance de la reivindicación si no

afectan materialmente al funcionamiento de la invención) o “que consiste en” (es decir, permitiendo sólo los elementos que figuran en la reivindicación que no sean impurezas o actividades intrascendentes que normalmente se asocian con la invención) en lugar del término “que comprende”. Cualquiera de estas tres transiciones puede ser usada para reivindicar la invención.

5 Se debe entender que un elemento descrito en esta memoria descriptiva no debe interpretarse como una limitación de la invención reivindicada a menos que explícitamente se cite en las reivindicaciones. Por lo tanto, las reivindicaciones concedidas son la base para determinar el alcance de la protección legal en lugar de una limitación de la especificación que se lee en las reivindicaciones. En contraposición, la técnica anterior se excluye
10 explícitamente de la invención en la medida en que realizaciones específicas anticipasen la invención reivindicada o destruyesen la novedad.

15 Por otra parte, no se pretende una relación especial entre dos o más limitaciones de una reivindicación a menos que dicha relación se cite de manera explícita en la reivindicación (por ejemplo, la disposición de los componentes en una reivindicación de producto u orden de pasos en una reivindicación de método no es una limitación de la reivindicación a menos que se indique expresamente que es así). Todas las posibles combinaciones y permutaciones de elementos individuales aquí divulgados se consideran aspectos de la invención. Del mismo modo, las generalizaciones de la descripción de la invención se consideran parte de la invención.

20 Las realizaciones descritas se deben considerar solamente como ilustrativas, no restrictivas, ya que el alcance de la protección legal proporcionado por la invención estará indicado por las reivindicaciones adjuntas más que por esta memoria.

REFERENCIAS

- 25 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R & Flavell R (2001) Recognition of double-stranded RNA activation and of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- 30 Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM & Davies DR (2005) The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10976-10980.
- Bell JK, Askins J, Hall PR, Davies DR & Segal DM (2006) The ARNdc binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8792-8797.
- 35 Brodsky I & Strayer DR (1987) Therapeutic potential of AMPLIGEN. *Am. Fam. Physician* 36, 253-256.
- Brown BA, Athanasiadis A, Hanlon EB, Lowenhaupt K, Wilbert CM & Rich A (2002) Crystallization of the Za domain of the human editing enzyme ADAR1 complexed with a DNA-RNA chimeric oligonucleotide in the left-handed Z-conformation. *Acta Cryst. D* 58, 120-123.
- 40 Choe J, Kelker MS & Wilson I (2005) Crystal structure of Toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 309, 581-585.
- 45 Ghazaryan AA, Dalyan YB, Haroutunian SG, Tikhomirova A, Taulier N, Wells JW & Chlikian TV (2006) Thermodynamics of interactions of water-soluble porphyrins with RNA duplexes. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 1914-1921.
- 50 Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA & Sidwell RW (2007) TLR-3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro virus infection by the double-stranded RNA (ARNdc), poly (I:C12U), but not poly (I:C): Differential recognition of synthetic ARNdc molecules. *J. Immunol.* 178, 5200-5208.
- 55 Gray DM, Hung S & Johnson KH (1995) Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes. *Meth. Enzymol.* 246, 19-34.
- Greene JJ, Alderfer JL, Tazawa I, Tazawa S, Ts'o PO, O'Malley JA & Carter WA (1978) Interferon induction and its dependence on the primary and secondary structure of poly(inosinic acid):poly(cytidylic acid). *Biochemistry* 17, 4214-20.
- 60 Greene JJ, Ts'o PO, Strayer DR & Carter WA (1984) Therapeutic applications of double-stranded RNAs. In: *Interferons and Their Applications* (Came PE & Carter WA, eds), Springer Verlag, Chapter 26.
- 65 Leonard JN, Ghirlando R, Askins J, Bell JK, Margulies DH, Davies DR & Segal DM (2008) The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 258-263.

Lesnik EA & Freier SM (1995) Relative thermodynamic stability of DNA, RNA and DNA: RNA hybrid duplexes: Relationship with base composition and structure. *Biochemistry*, 34, 10807-10815.

5 Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F & Reis e Sousa C (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997-1000.

Pitha PM, Marshall LW & Carter WA (1972) Interferon induction: Rate of cellular attachment of poly IC. *J. Gen. Virol.* 15, 89-92.

10 Schroeder M & Bowie AG (2005) TLR3 in antiviral immunity: Key player or bystander? *Trends Immunol.* 26, 462-468.

15 Sorrentino S, Naddeo M, Russo A & Alessio GD (2003) Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: Crucial role of noncatalytic basic amino acid residues. *Biochemistry* 42, 10182-10190.

Sumita M, DeSaulnier JP, Chan YC, Chui HMP, Clos L & Chow CS (2005) Effects of nucleotide substitution and modification on the stability and structure of helix 69 from 28S rRNA. *RNA* 11, 1420-1429.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, **caracterizado por que:**
- 5 el ARNdc tiene un peso molecular de aproximadamente 250 kDa a aproximadamente 320 kDa y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.
- 10
2. Un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, **caracterizado por que:**
- 15 el ARNdc tiene al menos una cadena de una longitud de aproximadamente 380 bases a aproximadamente 450 bases y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.
- 20
3. Un ácido ribonucleico de doble cadena (ARNdc) aislado que comprende una cadena sencilla compuesta de poli(ácido ribocitidílico₄₋₂₉uridílico) y una cadena opuesta compuesta de poli(ácido riboinosínico) de tal manera que las dos cadenas no forman un dúplex en la posición de la base uracilo, de modo que dichas cadenas están parcialmente hibridadas, **caracterizado por que:**
- 25 el ARNdc tiene desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 38 vueltas de hélice de cadenas de ARNdc y es resistente a la desnaturalización en condiciones que son capaces de separar las cadenas de poli(ácido riboinosínico) y poli(ácido ribocitidílico) hibridadas.
- 30
4. El ARNdc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que sólo dicha cadena sencilla de dicho ARNdc, comprende una o más bases uracilo o guanina que no están emparejadas con la cadena opuesta.
5. El ARNdc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que ambas cadenas de dichos ARNdc, comprenden una o más bases uracilo o guanina que no están emparejadas con la cadena opuesta.
- 35
6. El ARNdc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho ARNdc se compone de $\text{ribo}(I_n)\cdot\text{ribo}(C_{11-14}U)_n$.
7. El ARNdc de la reivindicación 6, en donde dicho ARNdc se compone de $\text{ribo}(I_n)\cdot\text{ribo}(C_{12}U)_n$.
- 40
8. Una composición que comprende uno o más ARNdc diferentes como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Uso de ARNdc como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento o de una composición farmacéutica.
- 45
10. El ARNdc como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en una cantidad terapéutica para el tratamiento de un sujeto, siendo dicha cantidad terapéutica preferiblemente para infusión intravenosa; inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular; inhalación intranasal o intratraqueal; o administración intratraqueal, orofaríngea o sublingual.
- 50
11. La composición de la reivindicación 8 para su uso en una cantidad terapéutica para el tratamiento de un sujeto, siendo dicha cantidad terapéutica preferiblemente para infusión intravenosa; inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular; inhalación intranasal o intratraqueal; o administración intratraqueal, orofaríngea o sublingual.
- 55

FIGURA 1

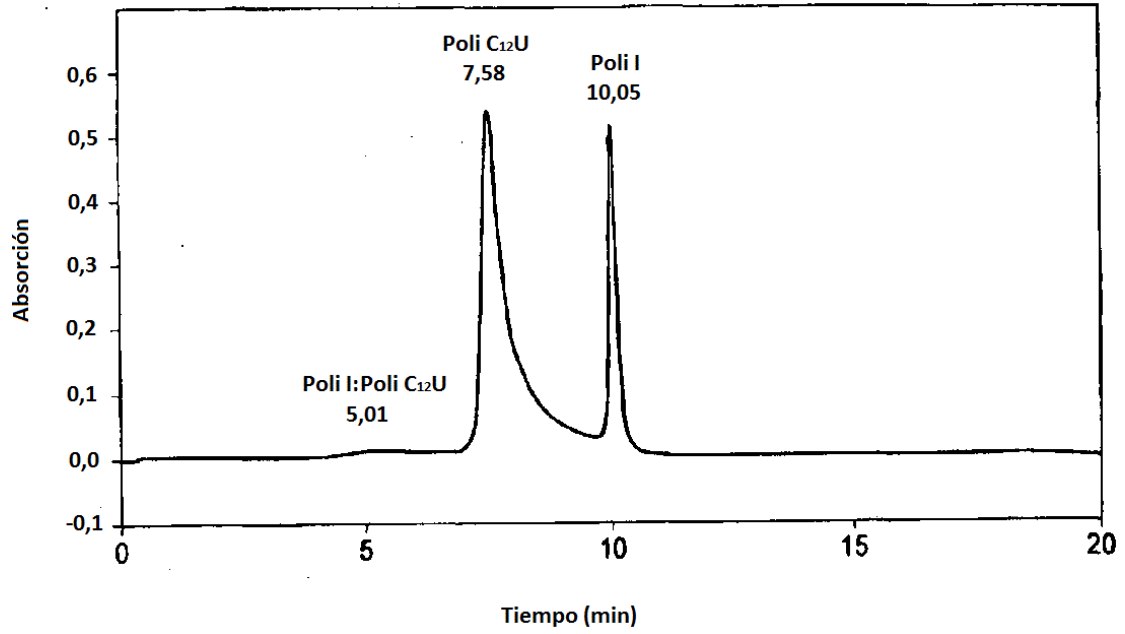


FIGURA 2A

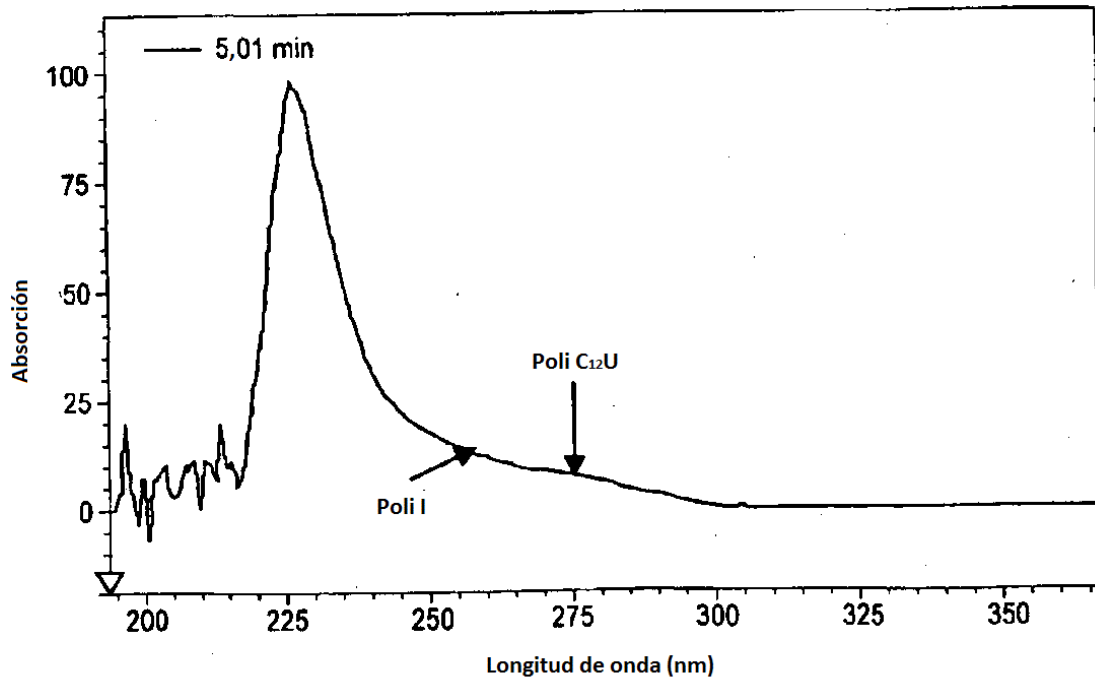


FIGURA 2B

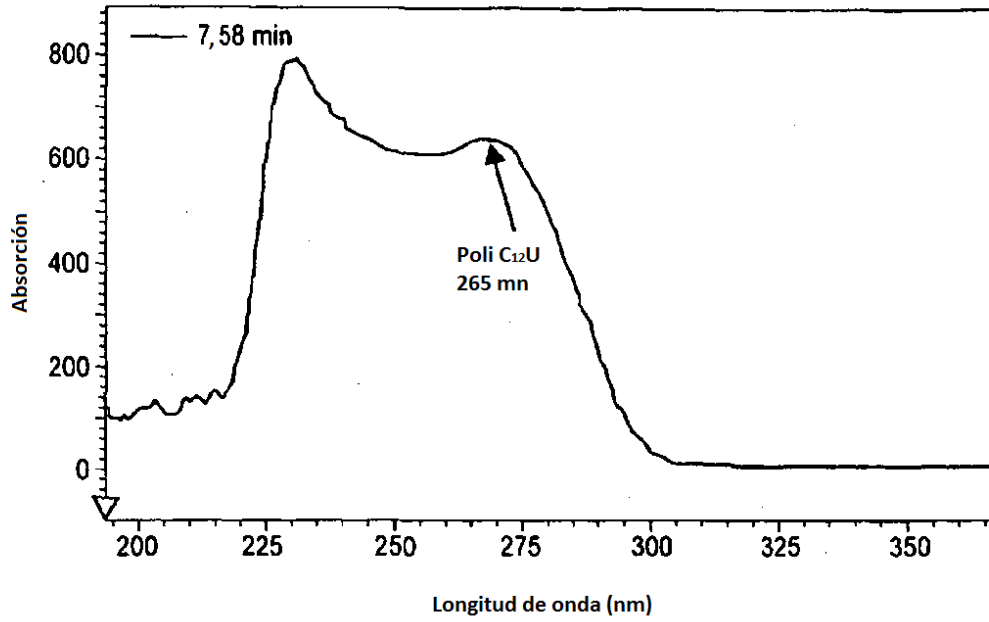


FIGURA 2C

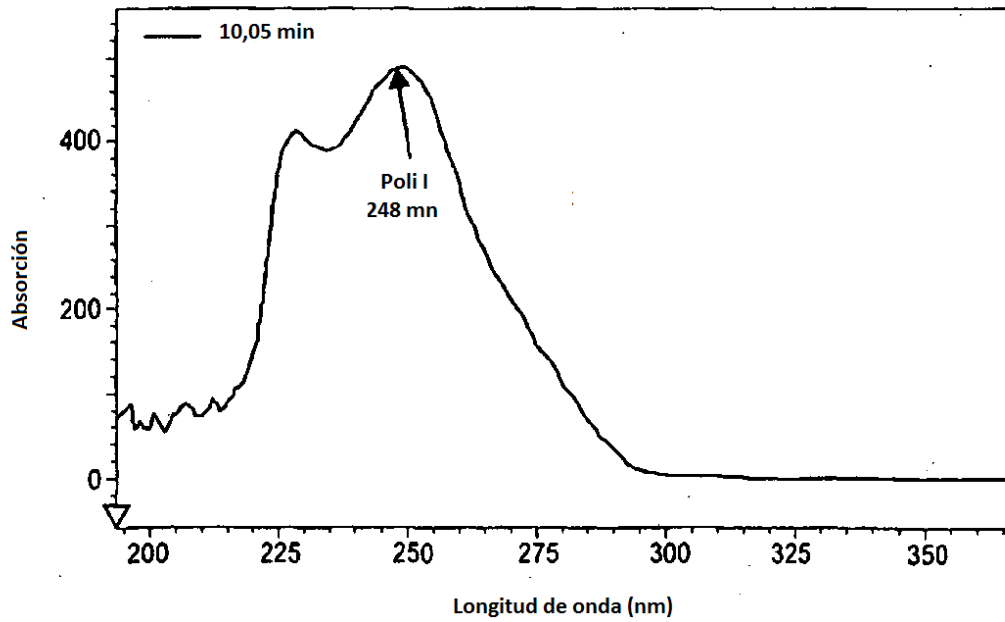


FIGURA 3A

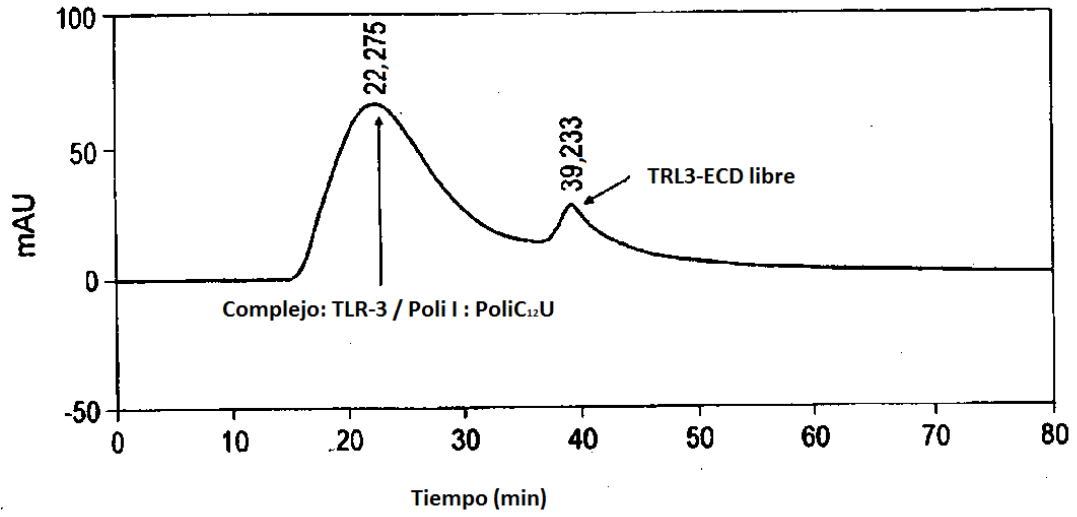


FIGURA 3B

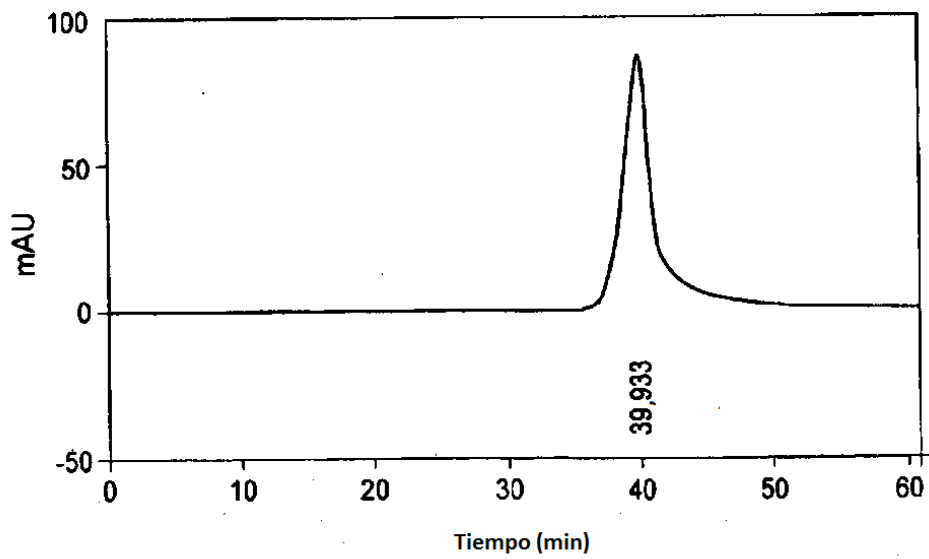


FIGURA 3C

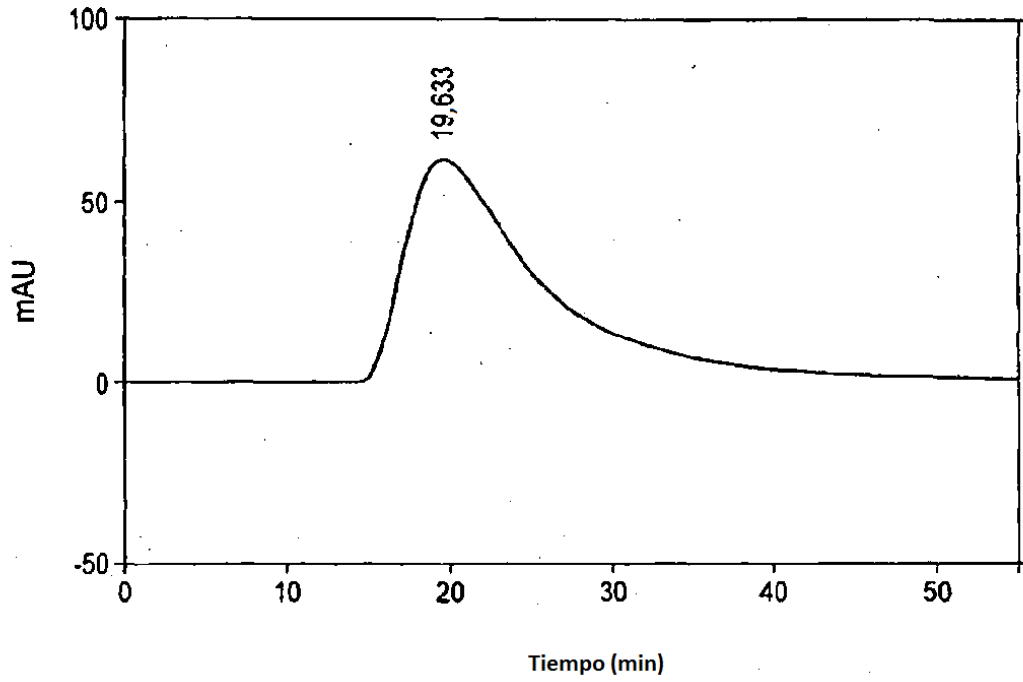


FIGURA 4

Conservación a temp elevada 40°C

S20,w
Lote 0301SD

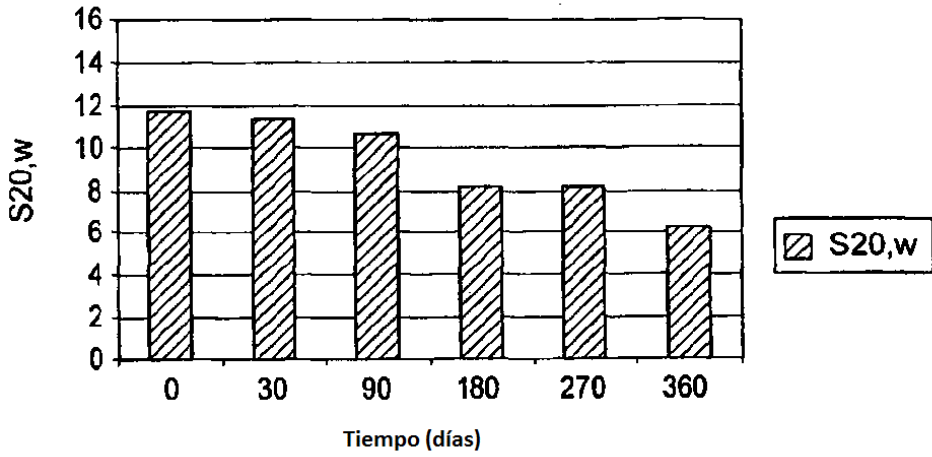


FIGURA 5

Conservación a temp elevada 40°C

Picos de pureza por HPLC
Lote 0301SD

