

20 JUL. 1978

ES

11	NUMERO	457602
22	FECHA DE PRESENTACION	6-4-77

A 1



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

P.- 65.345
HOE 76/B 008

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 26 16 406.7	14-4-76	Rep.Federal Alemana
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN AGENTE PARA LA PROFILAXIS Y TERAPIA DE LA GASTROENTERITIS".		
71 SOLICITANTE (S)		
BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana.		
72 INVENTOR (ES)		
Dr. Jürgen Knop y Dr. Fritz Behrens.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

LFG

1 La invención se refiere a un procedimiento para
la preparación de un agente inmunológico, administrable
por vía oral, para la profilaxis y terapia de las gastro-
enteritis, especialmente de las gastroenteritis infantiles,
5 de seres humanos.

Las gastroenteritis infantiles (diarreas) de se-
res humanos y de animales, han sido desde siempre un pro-
blema importante. Desde hace muchos años se ha buscado,
hasta ahora inutilmente, un agente profiláctico y terapéu-
10 tico eficaz.

En 1969 se pudo aislar, en terneros, el agente
causante de una gran parte de las diarreas de estos anima-
les, el virus de la diarrea de terneros de Nebraska (NCDV).
En 1975, se conoció, asimismo, que la diarrea de terneros
15 podía evitarse con calostro de animales originalmente in-
munes contra el NCDV y contra virus no diferenciables, tan-
to antígenicamente como morfológicamente.

A partir de 1973, se aisló, en muchos casos de ga-
stroenteritis infantiles en seres humanos, un virus (Rota-
virus) de los excrementos de niños enfermos. Sin embargo,
20 no se sabe si el virus aislado se considera como agente pa-
tógeno de la gastroenteritis infantil.

25 Sorprendentemente se ha encontrado ahora que anti-
cuerpos, contra Rotavirus y/o NCDV, administrados por vía
oral, obtenibles del calostro y/o de la leche de ruminantes
inmunizados, proporcionan una protección frente a una gas-
troenteritis provocada experimentalmente por Rotavirus en

1 primates. El síndrome clínico en los primates es muy seme-
jante al de las gastroenteritis conocidas en el caso de se-
res humanos, en las que hasta ahora no había podido encon-
trarse ningún agente infeccioso, especialmente en las que
5 son denominadas diarreas de invierno.

Es objeto de la invención, por consiguiente, un
procedimiento para la preparación de un agente para la
profilaxis y terapia de la gastroenteritis en primates, ca-
racterizado porque se inmunizan rumiantes con virus de dia-
10 rrea de terneros de Nebraska y/o con virus serológicamente
afines, se obtiene la fracción de gamma-globulina que con-
tiene anticuerpos a partir del calostro o de la leche de
los rumiantes inmunizados, y se prepara esta fracción en
forma de un agente administrable por vía oral y que entra
15 en acción en el tracto gastrointestinal. Preferiblemente,
los anticuerpos se obtienen de la leche de los rumiantes.

Se prefieren anticuerpos de secreción de la cla-
se IgA, IgG e IgM. Se sabe de tales anticuerpos que éstos,
como anticuerpos de secreción, poseen un tiempo de semivida
20 en el intestino, más prolongada que anticuerpos del suero.
Tales anticuerpos están presentes, en grandes cantidades,
en el calostro e en la leche y, además, en los jugos intes-
tinales y en la saliva. Pueden obtenerse, por ejemplo, de
la leche de rumiantes inmunizados con NCDV y/o virus afines
25 serológicamente (Rotavirus).

No obstante, de acuerdo con la invención, se pueden
emplear también anticuerpos que se obtienen, de la manera
usual, por inmunización de animales y obtención desde sus

1 sueros. Para ello se administran a rumiantes enteral y/o pa
renteralmente virus de diarrea de terneros de Nebraska y/o
virus serológicamente afines, especialmente Rotavirus, en
una cantidad inmunizantemente activa, eventualmente con un
5 coadyuvante inmunológico, y, tras la formación de los anti
cuerpos, se extrae la leche o bien el suero de los animales.
El proceso de inmunización es comparable, por ejemplo, con
el descrito en la patente británica 988.175, patente alema-
na 10 22 356, así como en Med. Microbiol. Immunol. 162, 1 -
10 7 (1975).

Los virus descritos en la bibliografía en relación
con la gastroenteritis infantil, con las distintas designa-
ciones tales como Rotavirus, Orbivirus, similar al virus
Reo, Duovirus, parecen ser, según el conocimiento actual,
15 solamente sinónimos de un mismo agente patógeno. Posiblemen
te, éstos no son, sin embargo, idénticos y representan sola
mente virus afines o emparentados dentro de un grupo, que
se designa aquí por Rotavirus. Puesto que este o estos agen
tes patógenos no están todavía clasificados, puede modifi-
carse la nomenclatura. Virus antigenéticamente afines, cuya
20 afinidad o parentesco no ha sido todavía aclarado totalmen
te, pueden servir como antígenos de la misma manera o de
una manera muy similar.

Obtención de los antígenos

25 Se obtiene Rotavirus a partir de los excrementos de
niños enfermos, de la manera descrita en Diagnostic Procedu
res for Viral and Rickettsial Infections, de Melnick y
15037
(MLF)

1 Wenner, 4ª edición, página 561, New York, 1969, por centri-
fugación con números de revoluciones bajos y altos. El NCDV
se reproduce en cultivos de tejidos de células renales de
5 células de una línea permanente de células renales de cerdo
(FK 15). Después de una óptima reproducción del virus en es-
tas células se recoge la porción sobrenadante de cultivo in-
feccioso, en concentración de aproximadamente $10^6 - 10^7$ DI_{50}/ml ,
y sirve como material de partida para la inmunización.

10 Para la preparación del antígeno inactivado se efec-
túa una concentración de los virus mediante ultracentrifuga-
ción (granulación a aproximadamente 100.000 x g) o por ul-
trafiltración por el factor de 5 - 1.000, preferentemente
10 - 100. La inactivación puede realizarse con formaldehído,
15 según Lauffer, Biochemistry of Viruses, Pergamon Press, Ox-
ford 1958, o según LoGruppo, Ann. N. Y. Acad. Sci, 83 (1960),
con beta-propiolactona. Son posibles otros procedimientos
de inactivación, por ejemplo según Wiktor y otros, Appln.
Microbiol. 23 (1972).

20 Procedimiento de inmunización

Rumiantes hembras se infectan, por vía oral, con
NCDV o Rotavirus, capaces de reproducción, durante su perío-
do en que no producen leche, con una dosis activa de 10^4 a
 10^{10} , preferentemente de 10^7 a 10^8 , dosis infecciosa $_{50}$ (DI_{50}),
25 aproximadamente 8 semanas antes del nacimiento del feto. -
Cuatro semanas y una semana antes del nacimiento, se adminis-
tran NCDV o Rotavirus, capaces de reproducción y/o inactiva-
dos de la manera arriba descrita, con o sin coadyuvantes,
por ejemplo de la manera siguiente y en el mismo momento:

1 Se inyectan en cada caso aproximadamente 5 a 50 ml,
preferentemente alrededor de 10 ml, de antígeno capaz de
reproducción (concentración $10^4 - 10^{10}$ DI /ml) o inactiva-
do, por vía subcutánea, en el sistema de drenaje linfático
5 de la ubre total.

Se instilan en cada caso, aproximadamente 50 a 200
ml, preferentemente alrededor de 100 ml, de los mismos pre-
parados, en cada cuarto de ubre o en cada mitad de ubre, a
través del conducto mamal o galactóforo.

10 Se inyectan en cada caso aproximadamente 2 a 10 ml,
preferentemente alrededor de 5 ml, de los mismos antígenos,
por vía intramuscular.

Durante el período de lactancia, se instilan, en un
intervalo de varias semanas, preferentemente alrededor de 4
15 semanas, en cada cuarto de ubre o en cada mitad de ubre,
aproximadamente 50 a 200 ml, preferentemente aproximadamen-
te 100 ml, de NCDV o Rotavirus, del preparado arriba des-
crito, a través del conducto galactóforo. Además, con una
separación de varias semanas, preferentemente alrededor de
20 12 semanas, se inyectan aproximadamente 5 a 50 ml, preferen-
temente alrededor de 10 ml, del NCDV o Rotavirus del mismo
preparado, por vía intramuscular.

Son posibles otros procedimientos de inmunización,
por ejemplo, según Pasioka y otros, Can. J. Microbiol.
25 21: 655 (1974), o según Watson y otros, Res. Vet. Sci.

1 18 : 182 (1975).

Se pueden emplear también mezclas de antígenos.

5 Obtención de la fracción de gamma-globulina que
contiene anticuerpos, a partir del calostro y de la leche
de las rumiantes inmunizadas

La leche obtenida desde el día del nacimiento (ca-
lostro) se desgrasa y se descaseiniza de la manera descri-
ta por Knop y otros, en Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.
10 49 : 405 (1971).

Las gamma-globulinas se aislan del suero, mediante
precipitación con sulfato amónico, por ejemplo, de la mane-
ra descrita por Pasioka y otros en Can. J. Microbiol.
21:655 (1974). Estas se purifican adicionalmente por méto-
dos cromatográficos, por ejemplo, según Knop y otros en
15 Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 49: 405 (1971), y Knop y
otros en J. Infect. Dis. 130: 368 (1974). Alternativamente
se pueden emplear también, por ejemplo, los métodos descri-
tos por Hammer y otros en Eur. J. Biochem 6:443 (1968) y
por Pasioka y otros en Can. J. Microbiol. 21:655 (1974).
20 Seguidamente, se filtra en condiciones estériles y se com-
prueba la ausencia de agentes patógenos susceptibles de re-
producción.

Tales fracciones de gamma-globulina que contienen
25 anticuerpos contra NCDV, Rotavirus o sus afines serológi-
cos, constituyen los componentes esenciales del agente de

30

1 acuerdo con la invención para la profilaxis y terapia de
la gastroenteritis infantil.

Es especialmente ventajoso que el agente de acuer-
do con la invención se administre por vía oral y se haga
5 activo en el tracto gastrointestinal. La dosificación debe
rá adoptarse en dependencia del nivel de la concentración
neutralizadora de virus. Para concentraciones medias neu-
tralizadoras de virus de 1:500, se administran, por dosis,
entre aproximadamente 0,1 y 10 g, preferentemente entre
10 0,5 y 5 g, de preparados proteínicos que contienen anti-
cuerpos. Por lo regular, ésto corresponde a 1-100 ml o
5 - 50 ml de una solución de anticuerpos.

Al preparado de gamma-globulina se le pueden añadir
sustancias neutralizadoras de los jugos gástricos, tales
15 como bicarbonato sódico, carbonato magnésico, o sustancias
de vehículo, tales como hidróxido aluminico y estabilizado
res proteínicos, tales como aminoácidos o péptidos, por
ejemplo, glicina, de manera usual en medicamentos. La pre-
paración galénica tiene lugar de la manera conocida para
20 los medicamentos que son activos en el tramo gastrointesti
nal, administrables por vía oral.

El preparado puede ser empleado monoespecíficamente
o en una mezcla, junto con anticuerpos contra otros agentes
patógenos microbianos, tales como bacterianos u otros agen-
tes patógenos víricos de la gastroenteritis.
25

1 Determinación de la actividad del preparado de anticuerpos

5 La actividad antivírica se determina en el ensayo de neutralización de virus. Se ha mostrado como favorable que el preparado se ajuste a una concentración neutralizadora de virus de aproximadamente 1: 100 a 1: 1000, por ejemplo a 1: 320/ml.

Ejemplo 1.

10 Cinco monos de la raza Macaco, que han sido obtenidos por cesárea, y mantenidos separados de la madre, se infectan con 1.000 DI₅₀ de Rotavirus. Una hora más tarde se les administran, por vía oral, 10 ml del preparado de anticuerpos arriba descrito, con una actividad antivírica 1:320/ml, con ayuda de una jeringa sin cánula. Un grupo testigo de 5 monos recibió un preparado de inmunoglobulina, obtenida de manera igual, de rumiantes no inmunizadas (globulina testigo).

15 Los monos tratados con globulina testigo enfermaron todos ellos de diarrea, mientras que de los animales tratados con inmunoglobulina específica no enfermó ninguno.

20 Ejemplo 2.

25 Un grupo de 5 monos, mantenido de la misma manera, recibió, dos horas antes de la infección con 1.000 DI₅₀ de Rotavirus, una dosis de 10 ml por cada animal, del preparado de anticuerpos arriba descrito. El grupo testigo corres-

1 pondiente, de 5 animales, recibió en este momento, 10 ml
de globulina testigo. Mientras que todos los animales, que
habían recibido globulina testigo, enfermaron de diarrea,
5 todos los animales que habían sido tratados con inmunoglo-
bulina específica no mostraron ningún síntoma de ninguna
enfermedad.

Ejemplo 3.

Se infectaron 10 animales con 1.000 DI⁵⁰ de Rotavi-
rus. Después de la erupción o aparición de la enfermedad,
10 se trataron 5 animales con 10 ml cada uno de inmunoglobuli-
na específica, de concentración 1:320/ml, por vía oral. 5
animales recibieron, en este momento, 10 ml cada uno de glo-
bulina testigo.

15 Todos los animales tratados con globulina testigo
enfermaron gravemente. De los animales tratados con immuno-
globulina específica, 3 de los animales estaban, al cabo de
las 24 horas, libres de síntomas, uno de los animales mostra-
ba un curso de la enfermedad muy acortado y mitigado. En
20 uno de los animales no pudo influirse sobre el curso de la
enfermedad, al igual que en el grupo testigo.

25

30

1

5

REIVINDICACIONES

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento para la preparación de un agente para la profilaxis y terapia de la gastroenteritis en primates, caracterizado porque se inmunizan rumiantes con virus de diarrea de terneros de Nebraska y/o con virus serológicamente afines, se obtiene la fracción de gamma-globulina que contiene anticuerpos a partir del calostro de la leche de los rumiantes inmunizados, y se prepara esta fracción en forma de un agente administrable por vía oral y que entra en acción en el tracto gastrointestinal.

20

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los anticuerpos se obtienen de la leche de los rumiantes.

25

3ª.- Procedimiento para la preparación de un agente para la profilaxis y terapia de la gastroenteritis.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

30

24028

1

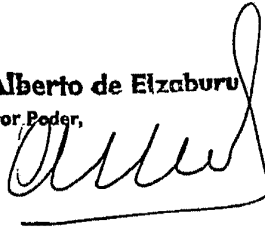
Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid, 01.MAR.1978

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder,



10

15

20

25

30

24028
jga

