

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

6 Nov. 1976

ES 68363

NUMERO	68363
FECHA DE PRESENTACION	

A1

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

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO P 27 14 665.2	32 FECHA 1 Abril 1977	33 PAIS ALEMANIA OCCIDENTAL.
---	--------------------------	---------------------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

PROCESO PARA LA FABRICACION DE UN PREPARADO DESTINADO AL TRATAMIENTO DE HERPES-ZOSTER.

71 SOLICITANTE (ES)

1.- D. ANTON MAYR
2.- D. HELMUT STICKL
3.- D. MELCHIOR WESTHUES.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1.- Veterinarstrasse 13 - 8 MUNCHEN 22 (Alemania Occ.).
2.- Staronweg 6 - 8033 KRAILLING (Alemania Occ.).
3.- Siebertstrasse 6 - 8000 MUNCHEN 8 (Alemania Occ.)

72 INVENTOR (ES)

Los Solicitantes, de nacionalidad alemana.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. Francisco GARCIA CADREERIZO. S/Ref.: 28928
N/Ref.: O.G. 33.864/AV.

En los últimos años han aumentado considerablemente las enfermedades llamadas "de factores", en las que se trata de enfermedades infecciosas, bacterianas condicionadas por virus y hongos, en animales de sangre caliente, originadas por las llamadas "bacterias oportunistas". Estos gérmenes se encuentran, bien en estado latente en el organismo o bien viven en simbiosis con nuestro cuerpo sin llegar a causar daños. Si por cualquier causa, se produce un descenso de la resistencia general (p. ej. por radiaciones de alta energía, por antimetabólitos, por enfermedades del sistema del aparato inmunizador, por hormonas etc.), en dichos casos estas enfermedades infecciosas se activan y pueden causar gérmenes patógenos muy difíciles de combatir.

Un ejemplo de lo antedicho es el Herpes Zoster, originado por el virus de la "Varicela-Zoster".

El Herpes Zoster se produce, tras haber enfermado una primera vez de varicela, a causa de una segunda lucha del organismo con el virus de la Varicela-Zoster, y por su naturaleza es una enfermedad, principalmente de tipo neurocutáneo. El Zoster sólo se da en personas, esta enfermedad no se produce naturalmente en animales ni tampoco se ha llegado a obtener un tipo experimental de zoster en el laboratorio.

Por el momento no se conoce una terapia universal y única para el zoster. Numerosos ensayos destinados a combatir y tratar el zoster, han tenido resultados insatisfactorios, entre otros casos p. ej. el tratamiento local con polvos y pomadas, la utilización de esteroides, de sustancias analgésicas y antirreumáticas, como asimismo la "interferonización".

La interferonización pasiva, es decir la aplicación de Interferon aislado, exógeno, tuvo sólo éxitos de breve duración y no se ha conseguido influenciar de manera notable sobre el zoster. Resultados más alentadores se han conseguido con la llamada "Inducción de Interferon", es decir la administración de sustancias que inducen a las células del cuerpo a la producción de Interferon. Sin embargo, también éstas sustancias, han demostrado tener una efectividad muy relativa, porque dichas sustancias - siempre que se trate de los llamados Inductores virales de Interferon - por la vía de la inmunización, quedan limitados en su actividad. Los inductores de Interferon sintéticos, han demostrado tener efectos negativos, porque atacan la sustancia genética de las células. Hasta el momento no se ha conseguido una interferonización satisfactoria, eficaz e inocua plenamente garantizada.

Por la patente DT-OS 2 437 166 es ya conocida la utilización de un virus Avipox atenuado, a través de 420 hasta 800 etapas de cultivo, para el tratamiento del herpes zoster y otras enfermedades infecciosas. El virus de Avipox, a través de estas etapas de cultivo ha mostrado tener las mismas características y la misma estabilidad.

El virus atenuado a través de 429 etapas (cultivos), y a continuación clonizado por tres veces (en la etapa 432), se ha presentado, con el nombre "Mayr-Stickl-Avipox-Interferon-Inducer", en el Instituto Estatal de Inmunología de Nordrhein-Westfalen, Departamento de Cultivo de Virus y Estudio de los mismos, § Düsseldorf.

El inconveniente de este virus de la varicela de las gallinas, descrito en la DT-OS 2 437 166, radica en su

todavía existente capacidad de multiplicación.

Se ha comprobado que, los virus virus variólicos y para-variólicos (Familia : Poxviridae), en especial el virus Avipox y el Virus Orf, tanto en su forma virulenta origina--
 5. ria, como en su forma no virulenta, atenuada, mediante las -- radiaciones gamma, no sólo han perdido su capacidad de repro-- ducción y multiplicación, sino que simultáneamente se han -- aumentado sus características de actividad y efectividad bio--
 10. lógica contra las infecciones por herpes; esto es sorprenden-- te, porque, en general por un tratamiento de inactivación, se suele perder la efectividad.

Para esta inactivación son adecuados unas radiacio-- nes gamma (γ), con las que se consigue una atenuación y da-- ñado selectivo de los ácidos nucleicos del virus, sin que se
 15. produzca simultáneamente un daño o modificación de las res-- tantes estructuras virales, en especial de la estructura su--
 perficies del virus, de la proteína del virus y de las sus--
 tancias envolventes.

Se ha podido comprobar, sorprendentemente, que con
 20. el preparado viral, tratado de acuerdo con el invento, no só-- lo se ha logrado una efectividad medicinal por vía parente--
 ral, sino también en los tratamientos locales.

Para la obtención de los preparados según el inven-- to, se inoculan cultivos celulares con los virus a emplear;
 25. en el punto más elevado de la multiplicación de los virus, -- se recolectan y depuran los virus, de los cultivos, según --
 procedimientos ya conocidos. La cosecha limpiada y depurada
 de los virus, es examinada en cuanto al contenido de virus/ml,
 y el material vírico a inactivar se ajusta a un título o con--
 30. tenido, como mínimo de aproximadamente $10^{7.0}$ ID₅₀/ml; de pre

ferencia a un contenido de la suspensión del virus de más de 10^8 ID₅₀/ml. El preparado tiene, sin embargo, efectividad, -- cuando el contenido es como mínimo de aprox. 5×10^6 ID₅₀/ml, en su límite inferior. Para una efectividad óptima, se recomiendan contenidos de hasta 5×10^8 ID₅₀/ml, aproximadamente.

Para la subsiguiente radiación con rayos gamma, de la cosecha vírica, obtenida como se ha indicado, se obtiene, para cada cepa de virus, por el procedimiento ya conocido, -- una cinética de inactivación, y según la cual, el tratamiento de la radiación debe durar, sólomente hasta el momento en que todos los virus del material iniciador hayan perdido su capacidad de multiplicación.

Para la cinética de inactivación, tienen, en especial, las siguientes magnitudes gran importancia : clase, -- concentración, medios y volumen del material vírico, material del recipiente y fuente de energía. Al material vírico inactivado, se le adicionan de preferencia, estabilizadores apropiados, como p. ej. leche desnatada al 2% o peptona.

A continuación los materiales inactivados son sometidos a un proceso de liofilización, y el producto desecado obtenido, es la sustancia base para la fabricación de las diversas formas de aplicación del preparado según el invento.

A continuación se describe, sobre un ejemplo, la obtención de un preparado según el invento.

El material de partida fué, el producto arriba citado, registrado como "Meyr-Stickl-Avipox-Interferon-Inducer", inocuo para personas y animales, siendo un virus variólico -- de aves de corral, y capaz de reproducirse y multiplicarse en cultivos de fibroblastos de embriones de gallina (FHE).

El virus pertenece a la cepa de los virus varió-

licos del pollo HP-1, que tras diversas etapas, ha llegado a obtenerse el FHE atenuado hasta la pérdida de la virulencia, y que tras la etapa 429 ha sido depurado en placas. La cosecha de virus de la tercera etapa de placas (etapa 432) se ha

5. multiplicado en FHE en huevos de "valo" (libres de leucosa), y se ha liofilizado. Esta cosecha es el material base para el preparado objeto de la solicitud (Virus de siembra o de cultivo). Para la fabricación del preparado según el invento, -- se reproduce y multiplica en FHE estacionario (Medio = líqui

10. do amónico cortical estéril). Las cosechas de virus son tratadas con ultrasonido, depuradas (con centrifugación fraccionada) y tras adición de albúmina de suero al 2,5%, es liofilizada. El preparado final presenta un contenido o título entre 10^7 hasta $5 \times 10^{8,5}$ KID 50/ml. La comprobación del conte

15. nido vírico, se efectúa por procedimientos ya conocidos sobre el FHE.

El virus, obtenido de la manera que acabamos de -- describir, para el material inicial (cosecha de virus), es -- inactivado mediante radiaciones gamma (bomba de cobalto; potencia de dosis aprox. 20 krad/min 500 ml de recipiente de cristal industrial), de 10^6 rad. en cuanto a su capacidad de multiplicación.

20.

La demostración de la inactivación del virus, se -- realiza mediante depositación de numerosas pruebas a diferentes volúmenes del material tratado, en cultivos celulares de células embrionales de fibroblastos de pollo. Si, transcurridos 9 días no se han producido ningún tipo de efectos citopatógenos sobre el terreno de cultivo de las células (CPE), -- ello puede considerarse como demostración de una inactivación completa de los virus.

25.

30.

Los preparados, así obtenidos, pueden emplearse -- de muy diversas formas de preparacion, p. ej.

1.- En suspensión en agua bidestilada estéril (1ml = $10^{7,75}$ KID 50/ml).

5. 2.- En tabletas o cápsulas (1 tableta o 1 cápsula = $10^{7,0}$ KID 50/ml; en la forma en tabletas, se parte de la fase líquida anterior a la liofilización), y

3.- Como spray o pulverización (1 ml de agua bidestilada y 10% de glicerina = $10^{7,5}$ KID 50/ml).

10. El preparado según el invento, pueda contener además sustancias aditivas auxiliares corrientes. Con ayuda -- del preparado según el invento se consigue un tratamiento -- eficaz de las infecciones por herpes de los animales de sangre caliente, en especial el tratamiento del Herpes-Zoster.

15. Tras la administración del preparado según el invento, dentro del marco de la resistencia no específica, se aumenta la fagocitosis, originándose una estimulación de -- los factores humorales de resistencia, en especial de anticuerpos complementarios de la IgM. Simultáneamente es excitada y activada la producción de Interferon, o bien se aumenta la producción ya existente de Interferon, o bien es liberado el Interferon ya previamente producido. Paralelamente se desarrolla una infiltración de macrófagos en el bazo, en el hígado y en las glándulas linfáticas, aumentando los monocitos en la circulación sanguínea. En general se puede decir que la actividad macrofágica (fagocitosis, actuación de antígenos) aumenta hasta un 400% con respecto a los valores iniciales.

La efectividad del preparado según el invento, puede demostrarse en el modelo SVS- (infección estandarizada --

de orias de ratón con el virus de la Estomatitis Vesicular), que, por razones técnicas y como consecuencia de su excelente reproductibilidad, se ofrece como muy apropiado para el ensayo y examen del preparado según el invento.

5. Se procedió a inyectar 276 ratones con el virus de la Estomatitis Vesicular, muriendo 224 de los ratones inculados (81%), en los días siguientes.

Un grupo de 201 animales fueron tratados previamente con el preparado, no sometido a tratamiento según el invento, es decir con el virus de Avipox, siendo la mortalidad de los animales inculados de tan sólo 85 animales, es decir sólo el 42,3%, de los animales controlados.

10. Un grupo de 125 animales fué tratado con el preparado según el invento, siendo la mortalidad en este grupo de animales de sólo 18 animales, es decir que la mortalidad fué de un 14,4%, es decir $1/5$ menos que la mortalidad observada en los animales inculados y no tratados con el preparado.

20. En lo que se refiere a la rapidez en la presentación de los animales estudiados, los animales inculados y no tratados, murieron, por término medio tras 5,3 días de la inoculación con el virus; los animales tratados con el producto de comparación, lo hicieron aproximadamente a los 19,5 días, y los animales inculados y tratados con el preparado según el invento, no sucumbieron hasta 33,3 después de la inoculación.

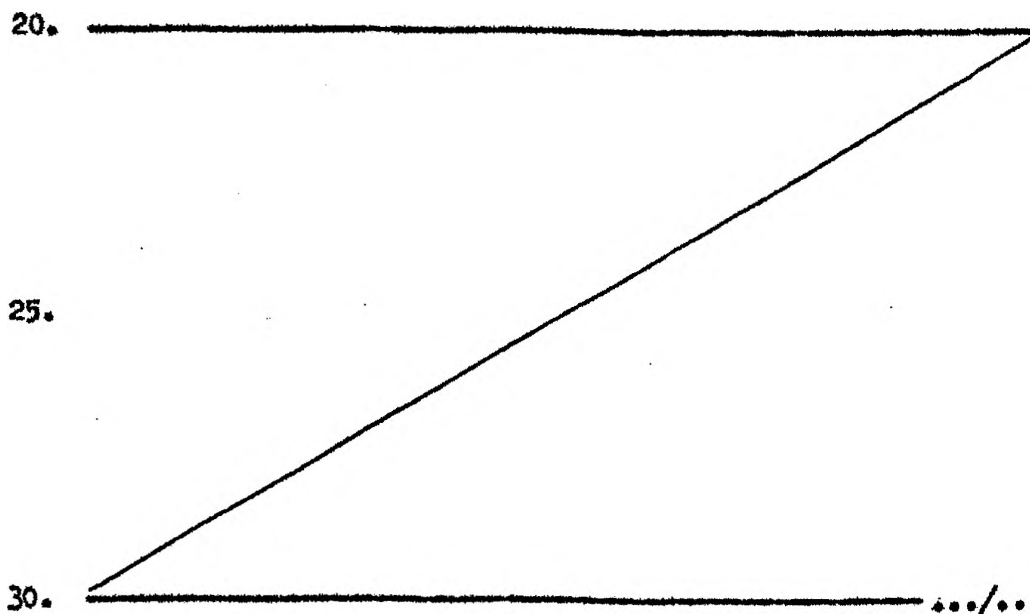
La tabla siguiente, permite comprobar que, el índice de efectividad con la misma cantidad de antígenos por dosis, se elevó de 48 a 82.

TABLACOMPROBACION DE EFECTIVIDAD DEL PREPARADO SEGUN EL INVENTO
EN EL MODELO VSV-

5.	Grupo de Ensayo	Número de los ensayos	Mortalidad	Indice de efectividad	Signifi cado	Término medio en el día de la muerte
10.	Prepara do no -- tratado según la DT-OS	8	85/201 42,3 %	48	+++	19,5
	2 437 166					
	Prepara do según el inven to	5	18/125 14,4%	82	++++	33,3
15.	Placebo (RAF)	11	224/276 81,2%	-	-	5,3

Cálculo de significado con el Test "Chi-Cuadrado"

p 0,01



Otra diferencia existente entre el preparado comparativo y el preparado según el invento, se deduce del examen de fagocitosis. Si a los ratones se les inyecta por vía intraperitoneal el preparado de comparación, susceptible de multiplicación, se produce una fagocitosis elevada, que se mide por medio de una solución de partículas de carbono. --

5. Transcurridas 48 horas, la aplicación del preparado en una solución del 1:16 provoca una elevación de la fagocitosis. En el preparado según el invento, se consigue el mismo efecto, en el mismo punto de tiempo con una solución al 1:64.

10.

Ejemplos de aplicación del preparado según el invento:

- 1) Una niña de 11 años, con un herpes en el rostro, observado desde hace tres días. Con ayuda de un pulverizador se pulveriza e inhala intranasalmente, 0,5 ml cada vez, del preparado obtenido como antes se ha descrito. Administración : el primer día 3 veces, el segundo día 2 veces, el tercer día 1 vez. Transcurridas 48 horas descenso de los dolores y molestias, y comienzo de cicatrización del herpes del rostro (Se dispone de fotografías). Caída de las costras a los 12 días (normalmente no se produce antes de los 32 días).
- 15.
- 2) Un hombre de 51 años con úlcera de duodeno, y estado general desfavorable. Zoster a la altura de la séptima hasta la décima costilla, desde el pecho hasta la espalda. Presencia de gran cantidad de ampollitas, recrudescimiento de las mismas al cuarto día de la aparición de las primeras ampollas. Dolores muy intensos, con ataques de dolor, especialmente por las noches.
- 25.
- Administración de un total de 48 pastillas fabricadas se
- 30.

gún proceso anteriormente descrito, tomándose cada vez 6 pastillas masticables, con una distancia de tomas de 4 a 6 horas (manteniendo una pausa nocturna de 8 horas como mínimo). Duración del tratamiento 3 días.

5. Atenuación de los dolores ya en el primer día del tratamiento, desaparición total del dolor al tercer día de tratamiento. Formación de la costra, al sexto día del tratamiento, y caída de la costra al 18 día de comienzo. Con la mejoría del grave Zoster, mejora también de la
10. úlcera de duodeno. Se redujeron también las manifestaciones catarrales de la sinusitis, quedando libre la respiración nasal.
- 3) Jovencita de 23 años, con cistitis recidiva crónica (Coli-bacterias, "Soor" en los cultivos de la orina). Diversos tratamientos convencionales no han tenido éxito
15. duradero. Administración de 36 tabletas, del producto arriba indicado según el invento, a lo largo de 3 días. Mejora de los síntomas (ardores y picores al orinar) a partir de una semana del comienzo del tratamiento, y a
20. partir de entonces mejoría total para largo tiempo.

N O T A

- La Patente de Invención que se solicita por veinte años para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "PROCESO PARA LA FABRICACION DE UN PREPARADO DESTINADO AL TRATAMIENTO DE HERPES-ZOSTER", con Prioridad de la solicitud de Patente en Alemania Occidental número P 27 14 665.2 de fecha 1 de Abril de 1.977, según las características esenciales de las siguientes:

- - - - -

.../...

REIVINDICACIONES

- 1^a.- Proceso para la fabricación de un preparado destinado al tratamiento de Herpes-Zoster, caracterizado -- por el hecho de inocular cultivos de células con virus va--
5. rídicos o para-variólicos (Familia : Poxviridae), y en el punto álgido de la multiplicación de los virus, se recolectan y depuran dichos virus; la cosecha de virus depurada, -- se ajusta a un título o contenido de aproximadamente 5×10^6 hasta 5×10^8 ID₅₀/ml de suspensión de utilización del vi--
10. rus; mediante radiaciones con rayos γ (gamma), se efectúa -- una destrucción selectiva de los ácidos nucleínicos del virus, sin que ello implique la destrucción o modificación de las restantes estructuras virales, en especial de las estruc--
15. turas de superficie del virus, de la proteína del virus y -- de las sustancias envolventes; y a continuación en su caso, se procesa y trata el virus con estabilizadores y/o otras -- sustancias auxiliares, hasta conseguir un preparado para -- aplicación intraperitoneal o local.

- 2^a.- Proceso para la fabricación de un preparado destinado al tratamiento de Herpes-Zoster, según reivindi--
20. cación 1, caracterizado por el hecho de que, el compuesto -- registrado bajo el nombre "Mayer-Stickel-Interferon-Inducer", atenuado a través de 420 hasta 800 fases de cultivo de células, se somete, sobre esta anchura de fase, a los virus Av₁
25. pox, idénticos y estables a un proceso de radiaciones γ (gamma).

- 3^a.- Proceso para la fabricación de un preparado destinado al tratamiento de Herpes-Zoster, según una de las reivindicaciones 1 hasta 2, caracterizado por el hecho de --
30. que los virus son inactivados mediante una radiación de ra--

yoa Y , con una cantidad de radiación preferentemente entre 8×10^5 hasta 10^7 rad.

4.- Proceso para la fabricacion de un preparado destinado al tratamiento de Herpes-Zoster, según una de las reivindicaciones 1 hasta 3, caracterizado por añadir al preparado, adicionalmente, estabilizadores apropiados, como pueden ser : albúmina, peptona etc.

5.- "PROCESO PARA LA FABRICACION DE UN PREPARADO DESTINADO AL TRATAMIENTO DE HERPES-ZOSTER".

10. Según queda sustancialmente descrito en esta memoria descriptiva que consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

30 MAR 1975

- 1.- D. ANTON MAYR.
- 2.- D. HELMUT STICKL.
- 3.- D. MELCHIOR WESTHUES.

15.

P.P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO
P.P.

Firmado: M. Dolores Jerquera