

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedida por el Ministerio de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

477.060

19 ES
21
22

NUMERO	22.1.79
FECHA DE PRESENTACION	477.060

10 A1

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES: 51 NUMERO 5368-1978 134026-1978	52 FECHA 22.1.78 31.10.78	53 PAIS Japón 11
--	---------------------------------	------------------------

49 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION
UN METODO PARA LA PREPARACION DE INTERFERON

71 SOLICITANTE (ES)
1) KEN HAYASHIBARA
2) SHIN ASHIDA

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
1) 9-8, 4-chome, Higashifurumatsu Okayama-shi Okayama JAPON
2) 148-3, Uchidekasugacho, Ashiya-shi, Hyogo - JAPON

72 INVENTOR (ES)
Kaname Sugimoto y Shokichi Yuen, japoneses

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 La presente invención se refiere a interferon y a preparaciones que contienen interferon para la prevención y tratamiento de enfermedades sensibles al interferon.

5 Tal como describen Shigeyasu Kobayashi, ["Interferon" (1975), publicado por Kodansha, Ltd., Tokio], D.A. J. Tyrrell, ["Interferon and Its Clinical Potencial" (1976), publicado por William Heinemann Medical Books, Ltd., Londres] y como se describe en "Protein, Nucleic Acid and Enzyme", Vol. 21, nº 4 (1976), publicado por Kyoritsu Shuppan
10 Co., Ltd., Tokio, interferon es un término que se utiliza para definir una sustancia de naturaleza próxima a proteína inducida intracelular o extracelularmente por células vivas, una vez expuestas las células a un inductor de interferon tal como un virus, una bacteria, un protozoo, rickettsia, un ácido
15 nucleico, una endotoxina, o un polisacárido, todos los cuales tienen una actividad que inhibe inespecíficamente la multiplicación de varios virus en las células.

Debido a esta actividad, desde su descubrimiento, el interferon se ha considerado como agente terapéutico y preventivo prometedor para diversas enfermedades virásicas.
20

En años recientes, el desarrollo del interferon como producto de utilización médica ha tenido posteriores avances, debido particularmente a que se han reconocido sus actividades antitumorales sobre tumores virásicos y no virásicos.
25

Debido a que el interferon es específico en cuanto a especies, únicamente el interferon procedente de células humanas vivas es eficaz en la prevención y terapia de enfermedades humanas.

30 De un modo convencional se han empleado leu-

1 cocitos como células humanas vivas para preparar interferon.
Se han obtenido los leucocitos por separación a partir de
sangre fresca, pero la conservación y suministro de leucoci-
tos en gran cantidad y a bajo coste resulta extremadamente di-
5 fícil.

El empleo de células vivas obtenidas inoculan-
do células humanas establecidas a medios nutrientes y el cul-
tivo de las células in vitro ha constituido otro de los in-
tentos para la producción de interferon. Sin embargo los mé-
10 todos in vitro resultan impracticables en gran escala y a ba-
jo costo pues tienen las desventajas de necesitar una gran
cantidad de suero humano y de dar una multiplicación inesta-
ble, baja velocidad de multiplicación y baja concentración
celular.

15 Debido a la anterior situación, la produc-
ción industrial de interferon para la producción y/o terapia
de enfermedades humanas no se había conseguido hasta ahora.

Tras estudiar la producción industrial de in-
terferon, los solicitantes han encontrado que en lugar de ino-
20 cular y cultivar células humanas en un medio de cultivo in vi-
tro, es posible producir interferon con facilidad y con buen
rendimiento transplantando células humanas establecidas a
otros animales de sangre caliente o por inoculación de dichas
células humanas en una cámara de difusión y multiplicación de
25 las células en la cámara, dejando que los animales alimenten
las células con sus fluidos corporales nutrientes, exponiendo
después, in vivo o in vitro, las células multiplicadas resul-
tantes a la acción de un inductor de interferon. Otro aspec-
to de la presente invención es el hallazgo de que el inter-
30 feron obtenido por el método aquí descrito es una preparación

1 eficaz y superior para prevención y tratamiento de enfermeda-
des sensibles a interferon.

5 Según el primer aspecto de la presente inven-
ción, se proporciona un método de preparación de interferon,
método que incluye las etapas de (a) transplante de células
humanas establecidas al cuerpo de otro animal no humano, de
sangre caliente, o inoculación de las células en una cámara
de difusión que se conecta al cuerpo de dicho animal y multi-
plicación de las células mientras que se deja que el animal
10 alimente las células con sus fluidos corporales nutrientes,

(b) sometimiento in vivo o in vitro de las cé-
lulas resultantes a la acción de un inductor de interferon pa-
ra inducir el interferon y,

(c) recogida y purificación del interferon .

15 Según el segundo aspecto de la presente inven-
ción se proporciona una composición farmacéutica para preve-
nir y tratar enfermedades sensibles a interferon cuya compo-
sición incluye el interferon obtenido por el método de la pre-
sente invención.

20 En comparación con los procedimientos conven-
cionales que se utilizan para la multiplicación de las célu-
las in vitro, los procedimientos de la presente invención
tienen las ventajas de no requerir, o requerir mucho menos,
medio nutriente suplementado con suero humano caro, que la
25 multiplicación de las células establecidas pueden mantenerse
más fácilmente y que puede conseguirse una actividad de in-
terferon más elevada. Más particularmente, las células huma-
nas establecidas pueden multiplicarse fácilmente en otros
cuerpos de animales de sangre caliente bien por transplante
30 de las células a ellos o por inoculación de una cámara de di-

1 fusión, que contiene las células, a un animal alimentado de
la forma usual mientras se deja que el animal suministre su
fluido corporal a las células. Además, en comparación con los
5 métodos convencionales in vitro, la invención tiene las ca-
racterísticas adicionales de que las células humanas estable-
cidas se multiplican más estable y rápidamente y que se pue-
de alcanzar una mayor producción de células y un rendimiento
en interferon más elevado.

10 Se pueden utilizar cualesquiera de las célu-
las humanas establecidas, en tanto puedan multiplicarse fa-
cilmente cuando se transplantan a otros cuerpos de animales
de sangre caliente. Por ejemplo en la invención se pueden em-
plear células humanas normales establecidas tales como célu-
15 las OUMS-20, células OUMS-25, células HEF, células HUF-2 y cé-
lulas WI-38, como se informa en "Protein, Nucleic Acid and
Enzyme", vol. 20, nº 6, pago 616-643 (1975) publicado por
Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokio, y células establecidas de
rivadas de células de tumores humanos tales como la célula
20 Namalva, de la que se informa en "Journal of Clinical Micro-
biology", vol. 1 págs. 116-117 (1975), célula BALL-1, célu-
la TALL-1, célula NALL-1, de las que informa Isao Miyoshi,
["Nature", vol. 267, págs. 843-844 /1977)] y célula JBL, de
la que informa Isao Miyoshi, ["Cancer" vol. 40, nº 6, en
prensa (1977)].

25 En el presente método se puede utilizar cual-
quier animal de sangre caliente en el supuesto de que las cé-
lulas humanas establecidas se puedan multiplicar fácilmente
en dicho animal; por ejemplo aves, como un pollo o una pa-
loma, o un mamífero tal como un perro, gato, mono, cabra,
30 cerdo, animal bovino, caballo, conejo, cobaya, rata, hamster,

1 ratón normal y ratón sin pelo.

5 Debido a que en los animales pueden darse inmunoreacciones indeseables cuando se les transplanta las células humanas establecidas, se prefiere emplear animales en las formas más inmaduras posibles, esto es, huevo, embrión, feto, recién nacido o animales jóvenes con lo que se aprovecha la inmunoparálisis.

10 Previamente al trasplante de células, se puede pretratar el animal bien por irradiación con rayos X o rayos γ a 200-600 rem, o con un antiséptico o un agente inmunosupresor para deprimir las inmunoreacciones.

15 Es deseable un ratón sin pelo como animal de sangre caliente debido a que no posee, o posee muy bajas, inmunoreacciones y se les puede transplantar las células humanas establecidas y multiplicarse rápidamente en ellos sin pretratamiento del ratón.

20 La multiplicación de las células humanas establecidas puede estabilizarse además transplantando primero las células a un hamster y después transplantándolas a un ratón sin pelo donde es inducido el interferón con actividad incrementada.

25 En un caso así, las células multiplicadas se pueden además transplantar posteriormente del cuerpo de un animal de sangre caliente al cuerpo de otro animal de la misma especie, género, clase o división, excepto a humanos. Las células humanas establecidas pueden transplantarse a cualquier parte del cuerpo del animal con tal que se multipliquen fácilmente en esta parte del animal; por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal o subcutáneamente y en la cavidad alantóica.

30

1 En lugar de multiplicar las células humanas
establecidas directamente en los cuerpos de los animales, las
células humanas establecidas pueden inocularse y multiplicar-
se en una cámara de difusión de forma y tamaño adecuados, pre-
5 feriblemente equipada con una membrana filtrante con poros de
aproximadamente 10^{-7} a 10^{-5} m de diámetro, por ejemplo un fil-
tro de membrana, un ultra-filtro o un filtro de fibras hue-
cas, estando conectada la cámara al cuerpo de un animal ade-
cuado (por ejemplo intraperitonealmente) de manera que los
10 fluidos corporales nutrientes del animal puedan pasar a la
cámara para alimentar las células dentro de la cámara con el
nutriente.

Si es necesario, se pueden multiplicar las cé-
lulas humanas establecidas en la cámara de difusión mientras
15 se deja que el fluido corporal nutriente del animal de san-
gre caliente circule entrando y saliendo del medio nutriente
de la cámara para alimentar las células con el fluido nutrien-
te. En este caso, si la cámara se coloca sobre el cuerpo del
animal se puede observar el estado de multiplicación de las
20 células a través de la pared de la cámara, y se puede aumen-
tar el número de células por animal, posteriormente, sin sa-
crificar innecesariamente al animal con sucesivas separacio-
nes de la cámara, inoculando las células en otra cámara que
contiene medio nutriente fresco en su interior y colocando la
25 última cámara sobre los mismos animales.

El método de la cámara de difusión tiene las
características adicionales de poder utilizarse con cualquier
animal excepto humanos para multiplicación de células humanas
establecidas, que no requiere pretratamiento para deprimir
30 inmunoreacciones, y que las células humanas establecidas mul-

1 multiplicadas en la cámara pueden recogerse fácilmente sin con-
taminarse con las células animales porque las células huma-
nas no tienen contacto directo con las células animales y no
hay miedo de reacciones indeseables.

5 Después del trasplante de las células huma-
nas, el animal se alimenta según el método usual sin ningún
tratamiento especial.

10 El periodo de multiplicación de las células
humanas establecidas es usualmente de 1 a 20 semanas. Si las
células humanas transplantadas son las derivadas de leucoci-
tos humanos tumorales o normales, la velocidad de la multi-
plicación de las células es tan alta que la multiplicación se
puede alcanzar usualmente en el periodo de 1 a 5 semanas.

15 El número de las células humanas multiplica-
das se ha visto que es generalmente de aproximadamente 10^7 a
 10^{12} o más por animal.

20 En otras palabras, los procedimientos de la
invención son extraordinariamente ventajosos para producir
interferon debido a que el número de células transplantadas
o inoculadas al animal aumenta en aproximadamente 10^2 a 10^7
veces o más, lo cual supone aproximadamente 10^1 a 10^6 veces
o más que el incremento conseguido por inoculación y multi-
plicación de las mismas células en medio nutriente in vitro.

25 Las células humanas vivas multiplicadas pueden
inducirse a producir interferon por cualquier método conoci-
do. La parte del mismo cuerpo del animal donde las células se
multiplican puede exponerse a un inductor de interferon. Por
ejemplo, el interferon puede obtenerse por exposición directa
de las células humanas suspendidas que han sido multiplicadas
30 intraperitonealmente, o células de tumores humanos que se han

1 formado subcutaneamente, a un inductor de interferon para in
ducir, con ello, interferon, despues de lo cual el interferon
inducido se recoge de las células humanas expuestas y se puri
fica.

5 El interferon puede tambien inducirse por re-
cuperación de las células humanas multiplicadas de los cuer-
pos animales y exposición de las células a un inductor de in
terferon in vitro. Por ejemplo, las células humanas obteni-
das por recogida de células humanas suspendidas que han de
10 multiplicarse intraperitonealmente o células que se han ob-
tenido por disociación de un tumor humano masivo aislado que
se ha formado subcutaneamente en el cuerpo de un animal, se
suspenden en un medio nutriente mantenido a aproximadamente
20 a 40°C para dar una concentración de aproximadamente 10^5 -
15 10^8 células por ml. Despues, se exponen las células a un in-
ductor de interferon para inducir interferon con ello y el
interferon formado se recoge y purifica.

20 Cuando las células humanas se multiplican en
cámaras de difusión, se pueden exponer las células a induc-
tores de interferon directamente en las cámaras o despues de
recoger las células de las cámaras.

25 En la inducción de interferon, la producción
de interferon puede aumentar además por métodos conocidos ta-
les como el método de imprimación empleando interferon y el
método de superinducción utilizando un inhibidor metabólico.

30 La producción de interferon por animal puede
aumentarse además por los métodos siguientes: (a) un método
en el que el número de células vivas por animal se puede au-
mentar posteriormente, sin necesidad de sacrificio innecesario
del animal, por separación sucesiva de dicha cámara de

1 difusión, inoculando las células en otra cámara de difusión
que contiene medio nutriente fresco en su interior y colocan
do la última cámara sobre el mismo animal, (b) un método en
el que las células humanas que se han multiplicado en el cuer
5 po del animal son expuestas a un inductor de interferon in vi
vo y/o in vitro para inducir interferon utilizando las mis-
mas células una o más veces.

Se puede utilizar cualquier inductor de inter
feron conocido, por ejemplo un virus, bacteria, protozoo,
10 rickettsia, ácido nucleico, endotoxina o polisacárido.

El interferon formado puede purificarse facil
mente por métodos de purificación conocidos, por ejemplo,
por precipitación con sal, diálisis, filtración, centrifuga
ción, concentración y liofilación. Si es necesario, se puede
15 purificar posteriormente la preparación de interferon obteni-
da por los métodos conocidos tales como adsorción y desor-
ción con un cambiador iónico, filtración con gel, cromato-
grafía de afinidad, fraccionamiento en el punto isoelectrico
y electroforesis.

20 Los Ejemplos siguientes ilustran la presente
invención. En los Ejemplos la actividad del interferon se
determina por el método de reducción de placa con las células
FL derivadas del amnios humano, descrito en "Protein, Nu-
cleic Acid and Enzyme" vol. 20, nº 6, págs. 616-643 (1975)
25 publicado por Kyoritsu Shuppan Co., Ltd., Tokio.

El índice de hemaglutinina se ensaya según
el método descrito por J.E. Salk ["Journal of Immunology",
vol. 49, p. 87 (1944)].

EJEMPLO A

Producción de interferon

EJEMPLO A-1

1

5

10

15

20

25

30

Se transplantan subcutáneamente células BALL-1 establecidas derivadas de un humano en ratones sin pelo adultos y se alimentan en la forma usual durante 3 semanas. Se aísla 10 g aproximadamente de tumor masivo por ratón sin pelo que se ha formado subcutáneamente, se corta finamente y se suspende en solución salina que contiene tripsina para disociar el tumor en células y las células se recogen por centrifugación. Se lavan las células con un medio de Eagle esencial mínimo, a pH 7,2 y 37°C, que contiene 5% v/v de suero humano y se vuelven a suspender para dar una concentración de aproximadamente 5×10^6 células por ml. Se añade a la mezcla obtenida aproximadamente 100 unidades por ml de interferon específico para la especie humana purificado parcialmente, y se incuba la mezcla durante aproximadamente 2 horas, y después se añaden aproximadamente 300 volúmenes de hemaglutinina por ml de virus Sendai y se incuban durante 20 horas adicionales para inducir el interferon. La solución de la mezcla incubada se centrifuga, aproximadamente 1.000 x g, a 4°C aproximadamente para separar el precipitado constituido por células. El sobrenadante obtenido se dializa frente a solución tampón 0,1 M pH 2,0, que contiene ácido clorhídrico y cloruro potásico, a 4°C durante 48 horas, después se dializa frente a solución salina de tampón fosfato 0,01 M, pH 7,2, durante 12 horas, y se filtra cuidadosamente por filtración con membrana. Se concentra el filtrado y se liofiliza para llegar a un interferon en polvo con elevada actividad. La actividad de interferon es de aproximadamente 20.000.000 unidades por ratón sin

1 pelo.

EJEMPLO A-2

5 Se transplantan intraperitonealmente células OUMs-20 establecidas derivadas de un humano a ratones sin pelo adultos y se alimentan en la forma usual durante 5 semanas. Se inyectan intraperitonealmente los ratones con virus de enfermedad de Newcastle que originalmente tiene un índice de hemaglutinina de aproximadamente 3.000 pero que está casi por completo pre-inactivada por medio de irradiación ultravioleta, y se sacrifican al cabo de 24 horas, después de lo cual se recoge el fluido ascítico. Se centrifuga el fluido, aproximadamente 1.000 x g, a 4°C para separar el precipitado consistente en células. Se dializa el sobrenadante frente a solución tampón 0,1 M, pH 2,0, que contiene ácido clorhídrico y cloruro potásico, a 4°C durante 48 horas, después se dializa frente a solución salina con tampón fosfato 0,01 M, pH 7,2, durante 15 horas, y se filtra cuidadosamente por filtración de membrana. Se concentra el filtrado para dar una solución de interferon con actividad elevada. La actividad de interferon es de aproximadamente 700.000 unidades/10 ratones sin pelo.

EJEMPLO A-3

25 Hamsters recién nacidos, que han recibido una inyección intraperitoneal del conocido suero antilinfocítico de conejo contra timocitos de hamster y un trasplante subcutáneo de células JBL establecidas derivadas de humano, se alimentan en la forma usual durante 4 semanas.

30 Se aísla aproximadamente 30 g de tumor masivo por hamster formado subcutáneamente y se disocia de forma similar al Ejemplo A-1. Las células obtenidas se lavan con el

1 medio RPMI 1640, pH 7,4 y 37°C, que contiene 10% v/v de sue-
ro de ternera, y se vuelven a suspender para dar una concen-
tración de aproximadamente 2×10^7 células por ml. A la so-
lución de mezcla obtenida se le añaden 200 unidades por ml
5 de interferon purificado parcialmente el cual tiene especi-
ficidad para la especie humana, y se incuba la mezcla durante
una hora aproximadamente. Después de añadir 100 volúmenes de
hemaglutinina aproximadamente, por ml de virus Sensai, se in-
cuba la mezcla resultante durante 16 horas adicionales para
10 inducir interferon.

A continuación se purifica la solución obtenida
y se concentra en forma similar a la del Ejemplo A-2 para
dar una solución de interferon de elevada actividad. La ac-
tividad del interferon es de aproximadamente 15.000.000 unida-
des por hamster.
15

EJEMPLO A-4

Se transplanta por vía intravenosa células Na-
malva establecidas derivadas de un humano a ratas recién na-
cidas y se alimentan en la forma usual durante 4 semanas.

20 Se aíslan aproximadamente 50 g de tumor masivo
por rata formado subcutáneamente y disocia en forma similar
al Ejemplo A-1.

A continuación se tratan las células obtenidas
en forma similar al Ejemplo A-1 para inducir interferon. La
solución de interferon inducida se purifica y liofiliza si-
25 milarmente al Ejemplo A-1 para llegar a un polvo de interfe-
ron con elevada actividad. La actividad de interferon es de
aproximadamente 30.000.000 unidades por rata.

EJEMPLO A-5

30 Se someten ratones adultos a irradiación por ra-

1 yos X a aproximadamente 400 rem para debilitar sus inmunoreac-
ciones, se les transplantan subcutaneamente despues células
TALL-1 establecidas derivadas de un humano y se alimentan en
la forma usual durante 3 semanas.

5 Se aislan aproximadamente 10 g de tumor masivo,
que se ha formado subcutaneamente, por ratón y se disocian
en forma similar a la del Ejemplo A-1.

10 Las células obtenidas se tratan en forma análo-
ga a la del Ejemplo A-3 para inducir interferon. Se purifica
la solución de interferon obtenido, y se concentra similar-
mente al Ejemplo A-2 para dar una solución de interferon de
actividad elevada. La actividad del interferon es de aproxi-
madamente 8.000.000 unidades por ratón.

EJEMPLO A-6

15 Se transplantan subcutaneamente células humanas
OUMS-25 establecidas a hamster en forma análoga a la del
Ejemplo A-3 durante 3 semanas y despues se transplantan in-
traperitonealmente a ratones sin pelo de 10 días de edad. Se
alimentan los ratones sin pelo en la forma usual durante 5
20 semanas, se anestesian y se recoge el fluido ascítico. Se
centrifuga el fluido para recoger las células multiplicadas.
Se lavan las células y se deja que induzcan interferon en
forma similar a la del Ejemplo A-1. Se purifica la solución
de interferon obtenida y se concentra y purifica en forma
25 análoga a la del Ejemplo A-2 para dar una solución de inter-
feron con actividad elevada. La actividad de interferon es
de aproximadamente 2.000.000 unidades por ratón sin pelo.

EJEMPLO A-7

30 Se suspenden células JBL establecidas derivadas
de humano en solución salina en cámaras de difusión cilíndri

1 cas de plástico de 10 ml equipadas con membrana de poros de aproximadamente 0,5 micras de diámetro. Las cámaras se embeben intraperitonealmente en ratas adultas.

5 Las ratas se alimentan en la forma usual durante 4 semanas y se separan las cámaras.

Las concentraciones de las células en las cámaras es de aproximadamente 5×10^9 células por ml lo que es casi 10^3 veces mayor que la alcanzada in vitro sobre un medio nutriente en una incubadora de CO_2 .

10 Se tratan las células en forma similar a la del Ejemplo A-1 para inducir interferon. La solución de interferon obtenida se purifica, concentra y liofiliza para llegar a un polvo de interferon con elevada actividad. La actividad de interferon es de aproximadamente 30.000.000 unidades por rata.

EJEMPLO A-8

15 Se transplantan a cavidades alantoicas de huevos blancos fértiles, incubados durante 5 días a $37^\circ C$, células NALL-1 derivadas de un humano, y se incuban los huevos a $37^\circ C$ durante una semana.

20 Se abren los huevos y se recogen las células multiplicadas. Se tratan las células similarmente a como se hace en el Ejemplo A-1 para inducir interferon. La solución de interferon obtenida se purifica y concentra en forma análoga a la del Ejemplo A-2 para dar una solución de interferon con actividad elevada. La actividad de interferon es de aproximadamente 400.000 unidades/10 huevos blancos fértiles.

EJEMPLO A-9

25 El polvo de interferon preparado por el método del Ejemplo A-1, se purifica posteriormente por los métodos

30

1 descritos por G.Bodo (Simposio sobre Preparación, Normaliza-
ción y Uso Clínico de Interferon, "11th International Immu-
nobiological Symposium", 8 y 9 de Junio, 1977, Zagreb, Yugo-
5 lavia), es decir, por adsorción y desorción con intercambia-
dor de iones, fraccionamiento del peso molecular por filtra-
ción con gel, concentración y filtración cuidadosa con fil-
tro de membrana. La solución de interferon obtenida tiene una
actividad de 2×10^6 unidades por mg de proteína. La recupe-
ración de interferon es de aproximadamente 40%.

10 El interferon obtenido en los Ejemplos A-1 a A-9
puede utilizarse ventajosamente bien puro, o en mezclas con
una o más sustancias, como inyecciones y medicinas para uso
interno o externo para prevenir y tratar enfermedades huma-
nas sensibles a interferon.

15 La presente invención se ilustra a continua-
ción con los siguientes experimentos.

EXPERIMENTO 1

20 Tratamiento de enfermedades de
virus con el interferon (Ensayo
de inhibición de la multiplica-
ción del virus en vitro)

25 Se añaden a monocapas de células de pulmón de
embrión humano formado por cultivo primario en placas Petri,
6 cm de diámetro, 0, 1, 10 ó 100 unidades del interferon pre-
parado por el método del Ejemplo A-9 y se incuban las mezclas
obtenidas en una incubadora con CO₂ al 5% v/v a 37°C durante
20 horas. A las células se añade virus Varicella-zoster o ci-
tomegalovirus humano en una cantidad de aproximadamente 100
30 placas en el caso de las células que no llevan añadido inter-
feron. Se incuba la mezcla y se cuentan los números de las

1 placas formadas.

El efecto inhibitor del interferon sobre la mul
tiplicación del virus se determina utilizando la siguiente
ecuación.

5 Reducción en el número de placas (%) = $\frac{A - B}{A} \times 100$

donde A es el número de placas formadas cuando no se añade
interferon y B es el número de placas donde se ha añadido in
terferon.

10 Los resultados se dan en la Tabla 1.

Tabla 1.

15

	Virus de Varice- lla-zoster	Citomegalovirus hu- mano
0 unidades	0%	0%
1 unidad	12%	5%
10 unidades	53%	64%
20 100 unidades	91%	84%

Como se deduce de los resultados de la Tabla 1,
el interferon de la invención inhibe la multiplicación de vi
rus que originan enfermedades causadas por virus.

25 No se advierte ninguna anormalidad en las cé-
lulas humanas cultivadas cuando se añade el interferon a las
células.

EXPERIMENTO 2

30 Tratamiento de enfermedades no
virásicas con el interferon

1 (1) Ensayo de inhibición en la multiplicación de células
tumoraes in vitro.

5 Se añade a un medio RPMI 1640 suplementado con
suero de feto de ternera de 15% v/v el interferon preparado
por el método del Ejemplo A-9 para dar concentraciones de 30,
300 y 3.000 unidades por ml respectivamente. Las muestras re-
sultantes se inoculan con células de tumores humanos para
dar una concentración de 5×10^5 células por ml y se incu-
ban en incubadoras de CO₂ al 5% v/v a 37°C durante 5 días.
10 Después, se cuenta el número de células por ml de medio. Los
controles, preparados como antes con la excepción de que el
interferon se pre-inactiva por calefacción a 100°C durante 30
minutos, se incuban analogamente.

15 El efecto inhibitor del interferon sobre la mul-
tiplicación de las células se determina por la siguiente
ecuación.

Inhibición de la multiplicación celular

$$(\%) = \frac{(A-5 \times 10^5) - (B-5 \times 10^5)}{(A-5 \times 10^5)} \times 100$$

20 donde A es el número de células en el control, y B es el nú-
mero de células en el ensayo tratado con interferon.

Los resultados se dan en la Tabla 2.

25 Tabla 2

Concentración de interferon (unidades por ml)	Células de tumor humano			
	BALL-1	TALL-1	NALL-1	JBL
30	+18%	+12%	+21%	+19%
300	+57%	+61%	+63%	+54%
3000	+88%	+82%	+85%	+91%

30

1

Como se deduce de los resultados de la Tabla 2, el interferon inhibe extraordinariamente bien la multiplicación de las células de tumores tales como célula BALL-1, célula TALL-1, célula NALL-1 y célula JBL y el interferon es eficaz a una concentración que se encuentra en el intervalo de 30 a 3.000 unidades por ml.

5

(2) Ensayo de inhibición sobre la multiplicación de células tumorales in vivo.

10

Los ensayos se llevan a cabo en 8 ratones sin pelo, aproximadamente de dos meses de edad. Se transplantan células TALL-1 (células tumorales, $7,5 \times 10^6$ células por ratón sin pelo, transplantándose subcutáneamente en todos los ratones. Desde el tercer día del trasplante, 4 ratones reciben intraperitonealmente 20 dosis del interferon preparado por el método del Ejemplo A-3; una dosis de 10.000 unidades por ratón sin pelo, tres dosis por semana. Después de los trasplantes, se alimentan los ratones durante 48 días y se sacrifican. Se pesan los tumores húmedos formados en los ratones. Los 4 ratones que quedan, empleados como controles, se alimentan y sacrifican en forma análoga excepto en que no reciben interferon. Se pesan en húmedo los tumores masivos formados.

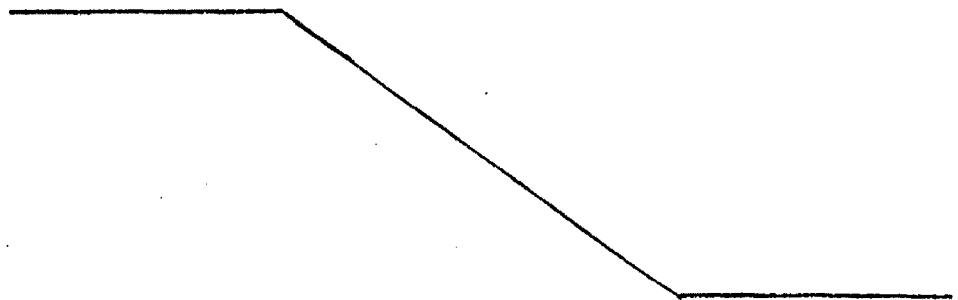
15

20

Los resultados se presentan en la Tabla 3.

25

30



1 Tabla 3

	Control	Ensayo tratado con interferon
5 1	5,8 g	1,6 g
2	8,8 g	1,1 g
3	4,3 g	0 g
4	7,5 g	0 g
10 Peso medio	6,6 g	0,7 g

(3) Ensayo de inhibición sobre la multiplicación de células tumorales in vivo.

15 El ensayo se lleva a cabo con 8 ratones sin pelo, de aproximadamente dos meses de edad.

Se transplantan subcutáneamente células JBL (células tumorales), 10^7 células por ratón sin pelo, a todos los ratones. Desde la tercera semana del trasplante, 4 ratones reciben intraperitonealmente 8 dosis del interferon preparado por el método del Ejemplo A-2; una dosis de 1.000 unidades por ratón sin pelo, dos dosis por semana. Después del trasplante, se alimentan los ratones durante 42 días y se sacrifican. Se pesan en húmedo los tumores formados. Se alimentan los 4 ratones que quedan, empleados como controles, se alimentan y sacrifican en forma análoga excepto en que éstos no reciben el interferon. Se pesan en húmedo los tumores formados.

Los resultados se presentan en la Tabla 4.

1 Tabla 4

5

	Control	Ensayo tratado con interferon
1	4,5 g	0,7 g
2	4,9 g	1,4 g
3	17,1 g	0,9 g
4	20,3 g	0,7 g
10	Peso medio	11,7 g
		0,9 g

15 Como se deduce de los resultados de las Tablas 3 y 4, el interferon inhibe la formación de tumores humanos masivos en ratones, y aunque se forme tumor, su peso es mucho menor que el de los controles. En comparación con los controles, los ratones sin pelo tratados con interferon tienen mayor apetito y son físicamente más activos.

20 EXPERIMENTO 3

Ensayo de toxicidad aguda

25 Los ensayos de toxicidad aguda se llevan a cabo con ratones de 20 días por inyección intraperitoneal de la solución de interferon preparada según el método del Ejemplo A-9. Los resultados dan una toxicidad extremadamente baja; LD₅₀ más de 20.000.000 unidades por kg cuando se inyecta peritonealmente en ratones.

30 Como se deduce de los experimentos descritos antes, las enfermedades sensibles a interferon mencionadas en la invención son aquellas que pueden prevenirse o tratarse con el interferon de la invención; por ejemplo enfermedades

1 virásicas, tales como queratoconjuntivitis epidémica, quera-
titis herpética, influenza, rubeola y hepatitis sérica y en-
fermedades no virásicas, tales como leucemia y osteosarcoma.

5 Las medicinas o agentes terapéuticos para las
enfermedades sensibles al interferon que contienen interfe-
ron pueden prepararse en varias formas y fases según el uso
final a que se destinan, por ejemplo, preparaciones líqui-
das tales como nebulizadores, colirios, gotas nasales, gar-
garismos e inyecciones, preparaciones en pasta tales como
10 unguentos, y preparaciones sólidas tales como polvos, gránu-
los o tabletas.

Las preparaciones son suficientemente eficaces
para prevenir y tratar las enfermedades sensibles al inter-
feron si contienen, por lo general, 1 a 10.000.000 unidades
15 de interferon por g. Si se necesita, se puede incorporar a
las preparaciones uno o más agentes terapéuticos, vehículos,
rellenos o estabilizadores.

A continuación se describen algunos aspectos
de las preparaciones que contienen interferon.

20

EJEMPLO B

Preparaciones

EJEMPLO B-1

Una preparación líquida

25

Se obtiene una preparación líquida con una so-
lución salina y el interferon obtenido según el método del
Ejemplo A-1 para dar una concentración de 500 unidades por
ml. La preparación es adecuada como nebulizador, colirio, go-
tas nasales y gargarismos para tratar y prevenir enfermeda-
des virásicas; particularmente queratoconjuntivitis epidémica
30 e influenza.

EJEMPLO B-2

Una solución inyectable

Se prepara una solución inyectable con solución salina y el interferon obtenido por el método del Ejemplo A-9 para dar una concentración de interferon de 100.000 unidades por ml.

La solución inyectable es adecuada para tratar todas las enfermedades sensibles al interferon tales como enfermedades virásicas y tumorales.

EJEMPLO B-3

Una solución inyectable

Se prepara una solución inyectable con 500 ml de solución acuosa de maltosa 10% p/v, 1.000.000 unidades del interferon preparado por el método del Ejemplo A-5 y 10 mg de ciclofosfamida. La solución inyectable es adecuada para tratamiento de enfermedades tumorales, en particular.

EJEMPLO B-4

Una solución inyectable

Se prepara una solución inyectable con 100 ml de una solución acuosa de maltosa al 10% p/v, 500.000 unidades del interferon preparado por el método del Ejemplo A-6 y 2 mg de mitomicina C. La solución inyectable es adecuada para tratar, en particular, enfermedades tumorales.

EJEMPLO B-5

Ungüento

Se prepara un ungüento en la forma usual por mezcla del polvo de interferon preparado por el método del Ejemplo A-4 con vaselina y parafina líquida para dar una actividad de interferon de 10.000 unidades por g. La preparación es adecuada para el tratamiento de enfermedades virási-

1 cas de la piel.

EJEMPLO B-6

Tabletas

5 Se preparan tabletas en la forma usual por tableteado de una mezcla del polvo de interferon obtenido por el método del Ejemplo A-7, almidón y maltosa para dar una actividad de interferon de 1.000 unidades por tableta (100 mg). Las tabletas son adecuadas para prevenir y tratar enfermedades virásicas del sistema digestivo.

10 EJEMPLO B-7

Una preparación líquida

15 Se obtiene una preparación líquida para administración oral con 10 ml de una solución acuosa de maltosa al 10% p/v, 200.000 unidades del interferon obtenido por el método del Ejemplo A-8 y 5 mg de metotrexato. La preparación es adecuada para tratamiento de enfermedades tumorales; particularmente.

En resumen la patente de invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de interferon que incluye las etapas de:

25

(a) transplante de células humanas establecidas a otro cuerpo animal, no humano, de sangre caliente, o inoculación de las células a una cámara de difusión, que está conectada al cuerpo de dicho animal y la multiplicación de las células mientras se deja que el animal suministre sus fluidos corporales nutrientes a las células,

30

- 1 (b) sometimiento in vivo o in vitro de las células -
resultantes a la acción de un inductor de inter-
feron para inducir el interferon y,
(c) recolección y purificación del interferon.
- 5 2. Un método, según la reivindicación 1, en el cual
las células establecidas son leucocitos.
3. Un método, según la reivindicación 1, en el que
las células establecidas son células Namalva, células TALL-1,
células BALL-1, células NALL-1 o células JBL.
- 10 4. Un método, según cualquiera de las reivindicacio-
nes 1 a 3, en el que el animal de sangre caliente es mamífe-
ro.
5. Un método, según cualquiera de las reivindicacio-
nes precedentes, según el cual la cámara de difusión tiene -
poros de aproximadamente 10^{-7} a 10^{-5} m. de diámetro.
- 15 6. Un procedimiento, según cualquiera de las reivin-
dicaciones precedentes, según el cual en la etapa (a) las -
células humanas se multiplican durante 1 a 20 semanas.
7. Un método, según cualquiera de las reivindicacio-
nes precedentes, en el que en la etapa (b) la concentración
20 de inductor de interferon se encuentra en el intervalo de
aproximadamente 10^5 a 10^8 células por ml.
8. Un método, tal como se reivindica en cualquiera -
de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa -
25 (b) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de -
20 a 40°C aproximadamente.
9. Se reivindica por último como objeto sobre el -
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN METODO PARA LA PREPARACION DE INTERFERON.
- 30

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la -
presente memoria descriptiva que consta de veintiseis pági-
nas mecanografiadas.

5 Madrid, 22 Enero 1979
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.



10

15

20

25

30