



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 355**

51 Int. Cl.:
A61K 39/275 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01965110 .8**

96 Fecha de presentación : **11.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1303302**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2003**

54 Título: **Uso de cepas del virus *Parapox ovis* contra fibrosis de órganos.**

30 Prioridad: **11.07.2000 DE 100 33 581**
08.05.2001 DE 101 22 233

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2010

73 Titular/es: **AiCuris GmbH & Co. KG.**
Friedrich-Ebert-Strasse 475
42117 Wuppertal, DE

72 Inventor/es: **Hirth-Dietrich, Claudia;**
Schlapp, Tobias;
Siegling, Angela;
Knorr, Andreas;
Weber, Olaf y
Theiss, Gudrun

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 355 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).

ES 2 332 355 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de cepas del virus *Parapox ovis* contra fibrosis de órganos.

5 La presente invención se refiere al uso en seres humanos de cepas aisladas de *Parapoxvirus ovis* de las cepas orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, cepas aisladas New Zealand (NZ) NZ2, NZ7 y NZ10 en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades que van acompañadas de una elevada deposición de colágeno pudiendo estar afectados tanto los órganos internos como, por ejemplo, el hígado como también la piel y sus estructuras anejas. Especialmente se refiere a fibrosis hepática o cirrosis hepática tras hepatitis víricas o enfermedades hepáticas inducidas por etanol, así como fibrosis quística.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de *Parapoxvirus ovis* D 1701 solo para la preparación de fármacos y preparaciones farmacéuticas con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano.

15 Además de las cepas de partida, también se refiere a las variantes obtenidas mediante subcultivo y/o adaptación a determinadas células, por ejemplo WI 38. Además de los virus completos, también son adecuados partes o fragmentos de estos virus. Por partes se entiende fragmentos genómicos o subgenómicos expresados mediante vectores adecuados, por ejemplo, Vaccinia en sistemas adecuados como cultivos de fibroblastos. Por fragmentos se entiende las fracciones obtenidas mediante purificación bioquímica como cromatografía o las partículas obtenidas después de aplicar procedimientos físicos como disgregación con ultrasonidos.

20 Se sabe que Parapoxvirus puede estimular la reacción inmunológica no específica de vertebrados. Baypamun[®], una preparación de *Parapoxvirus ovis* químicamente inactivado, cepa D1701, se utiliza en animales para la profilaxis, metafilaxis y terapia de enfermedades infecciosas, así como para la prevención de enfermedades inducidas por el estrés.

30 La patente DE 3 504 940 A (Mayr, Anton) enseña el efecto favorable de Baypamun[®] en estados como la inmunodeficiencia mediante irradiación rica en energía, quimioterapia, SIDA, inmunodepresión, lesiones asociadas a la edad, así como efectos desintoxicantes, pero no a la reducción inmediata de una fibrosis hepática. Además, el documento DE 3 504 940 enseña que Baypamun[®] como complemento respalda la eficacia de una terapia tumoral y que protege a recién nacidos de enfermedades provocadas por una defensa inmunológica materna insuficiente.

35 El documento WO 95/22978 describe el uso de una composición que contiene al menos dos o más cepas de Parapoxvirus como inductores de paramunidad, es decir, para la estimulación inespecífica del sistema inmunitario.

El documento WO 97/38724 describe el uso de una composición llamada "Conpind" que está constituida por las dos cepas víricas *Parapoxvirus ovis* D1701 y *Avipoxvirus gallinae* como inductores de paramunidad.

40 A partir del presente estado de la ciencia, ahora se ha encontrado de manera sorprendente que la administración de Parapoxvirus inactivado puede reducir o prevenir la fibrosis hepática. En modelos de animales, este efecto se encontró en el caso de fibrosis hepática inducida por tetraclorometano que se basa en una lesión hepática tóxica y en el caso de fibrosis hepática inducida por suero heterólogo, en la que no se produce una inflamación del hígado. Además, es sorprendente el grado del efecto terapéutico: la producción excesiva de colágeno en la fibrosis hepática se inhibe en el modelo de tetraclorometano hasta el 60%, en el modelo de suero se inhibe casi completamente. Acorde con estos resultados de experimentos a largo plazo, después de la administración única de tetraclorometano ahora pudo mostrarse que Baypamun[®] y las preparaciones obtenidas a partir de las cepas anteriormente mencionadas del *Parapoxvirus ovis* inhiben la transformación de las células estrelladas hepáticas en células del tipo miofibroblastos productores de colágeno.

50 La fibrosis hepática o cirrosis hepática puede producirse por diferentes noxas como, por ejemplo, infecciones víricas y alcoholismo, pero los diferentes patomecanismos desembocan en un trayecto final común, la producción de colágeno. Como muestran los resultados experimentales en animales de los modelos no infecciosos anteriormente expuestos, la administración de virus Parapox inactivados previene sorprendentemente la deposición de colágeno independientemente de la noxa inductora. Por tantos, los virus Parapox abren un novedoso principio de terapia para ejercer un efecto sobre el trayecto final común a todas las enfermedades que conducen a fibrosis.

Este efecto también sugiere una terapia especialmente eficaz de la fibrosis hepática víricamente inducida con preparaciones del virus Parapox ya que para tales preparaciones se conocen efectos inmunoestimulantes adicionales.

60 El fuerte efecto antifibrótico ahora descubierto de Baypamun[®] abre la posibilidad de utilizar Baypamun[®] o preparaciones de NZ2 como patrón de referencia para la evaluación de efectos antifibróticos en ensayos para descubrir sustancias antifibróticas.

65 Los virus Parapox inactivados o sus variantes y preparaciones obtenidas a partir de las cepas anteriormente mencionadas también poseen un espectro de acción antifibrótico universal y, por tanto, son adecuados no sólo para la profilaxis y la terapia de enfermedades fibróticas del hígado, sino también en enfermedades fibróticas de otros órganos como, por ejemplo, del pulmón, del páncreas, del corazón y de la piel. Se prefiere especialmente el uso de cepas aisladas del virus Parapox en la profilaxis y el tratamiento de fibrosis hepática y cirrosis hepática.

ES 2 332 355 T3

Dependiendo del planteamiento clínico, el agente terapéutico basado en Parapoxvirus se administra sistémicamente, es decir, por ejemplo intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, por vía oral, por inhalación o localmente. En este caso, Parapoxvirus se presenta o purificado y liofilizado y se suspende en un disolvente adecuado inmediatamente antes de la administración o se presenta en otra formulación adecuada o se presenta en una forma de administración por vía oral resistente a los jugos gástricos u otra forma de administración por vía oral.

En este caso pueden ser necesarias varias administraciones o tratamiento a largo plazo según esquemas cronológicos que se corresponden con los requisitos del planteamiento clínico.

La presente invención se refiere al uso de cepas aisladas del virus Parapox para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del humano. Las cepas aisladas del virus Parapox se obtienen a partir de las cepas D1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, así como de las cepas New Zealand (NZ) para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del humano. Preferiblemente se usan cepas New Zealand (NZ), las cepas NZ2, NZ7 y NZ10, para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano, prefiriéndose especialmente la cepa NZ2. Además, los virus Parapox anteriormente descritos pueden modificarse mediante subcultivo o adaptación a células adecuadas y tales virus Parapox obtenidos mediante subcultivo o adaptación usarse para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano, pudiendo usarse para el subcultivo o la adaptación, por ejemplo, células humanas como WI-38, MRC-5, células bovinas como BK-K13A47/Reg o MDBK y células ovinas como MDOK. También pueden usarse partes o fragmentos de los virus Parapox previamente mencionados para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano. Por partes se entiende fragmentos genómicos o subgenómicos expresados mediante vectores adecuados como virus de la variolovacuna en sistemas adecuados como cultivos de fibroblastos y por fragmentos las fracciones obtenidas mediante purificación bioquímica como cromatografía de partículas víricas expresadas o físicamente desintegradas, por ejemplo, mediante la acción de ultrasonidos. Otro objeto de la invención es el uso de las cepas anteriormente descritas de *Parapoxvirus ovis* o de las modificaciones obtenidas a partir de ellas como se describe previamente en combinación con otros agentes para la preparación de fármacos y preparaciones farmacéuticas con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano, así como el uso de Baypamun® solo o en combinación con otros agentes para la preparación de fármacos y preparaciones farmacéuticas con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano. Un objeto preferido de la invención es el uso de las cepas anteriormente descritas de *Parapoxvirus ovis* o de las modificaciones obtenidas a partir de ellas como se describe previamente en combinación con otros agentes en una formulación para la administración por vía oral, por ejemplo, en cápsulas resistentes a los jugos gástricos.

Además, es objeto de la invención el uso de *Parapox ovis* D 1701 o preparaciones de NZ2 como referencia para la evaluación de los efectos antifibróticos en ensayos para descubrir sustancias antifibróticas.

Parapoxvirus ovis NZ-2 mencionado en este documento a modo de ejemplo se depositó el 10 de julio de 2001 en la Colección europea de cultivos celulares, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, Reino Unido. El número de depósito es 0 107 1006.

Ejemplo 1

Efecto de Parapoxvirus ovis, cepa D 1701, Baypamun®

Metodología

La sustancia seca Baypamun®, una preparación obtenida a partir de *Parapoxvirus Ovis*, cepa D 1701, químicamente inactivado se disolvió según el protocolo con agua para inyección (título referido a la TCID50 (dosis infectiva en cultivo de tejido al 50% ("tissue culture infective dose")) aproximadamente 10^7 por ml).

Como disolución placebo se administró a los animales de los grupos de control una disolución de poligelina con el mismo contenido de proteínas que en la disolución de Baypamun®.

Por título y administración se administraron i.p 0,5 ml de disolución. La administración se realizó tres veces por semana, pero nunca en días consecutivos.

Baypamun® se probó en dos modelos de animal con diferente génesis de la fibrosis, el modelo de tetraclorometano y el modelo de suero de cerdo.

El tratamiento crónico con tetraclorometano es un procedimiento habitual para la inducción experimental de una fibrosis hepática con posterior cirrosis (McLean EK, McLean AEM, Sutton PM. Instant cirrhosis. Br. J Exp. Pathol. 1969; 50: 502-506). Se reconoce generalmente como modelo de la fibrosis y cirrosis hepáticas humanas. Se usaron ratas Sprague-Dawley hembra. Para la inducción máxima del metabolismo microsomal de tetraclorometano, los animales ya recibieron 1 g/l de isoniazida con el agua de beber una semana antes del inicio del tratamiento. El tetraclorometano se administró por vía oral cada cinco días a una dosis de 0,1 ml/100 g de peso corporal (tetraclorometano : aceite mineral = 1 : 1). Los animales se sacrificaron después de siete semanas de tratamiento y se estudiaron. El tratamiento con Baypamun® se realizó en paralelo al tratamiento con tetraclorometano.

ES 2 332 355 T3

El tratamiento con suero heterólogo, por ejemplo, suero de cerdo en ratas, también es un procedimiento frecuentemente aplicado en la bibliografía para inducir una fibrosis hepática con posterior cirrosis que, a diferencia de otros modelos, sólo produce una lesión e inflamación mínima de las células parenquimatosas hepáticas (Bhunchet, E. y Wake, K. (1992): Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 16: 1452-1473). Las ratas Sprague Dawley hembra se trataron i.p. 2 x semana con 0,5 ml/animal de suero de cerdo estéril (Sigma), los animales de control con disolución fisiológica estéril de cloruro sódico (2 x semana, 0,5 ml/animal, i.p.). El tratamiento con Baypamun® se realizó en paralelo al tratamiento con suero de cerdo, pero nunca el mismo día. Después de siete semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron y se extrajeron los hígados para la cuantificación del contenido de colágeno.

Para el estudio histológico del tejido hepático se perforaron cilindros de tejido transversales normalizados (aproximadamente 10 x 2 mm) del lóbulo anterior derecho del hígado. Las secciones congeladas se tiñeron con disolución de rojo de picrosirius al 0,1% para la detección de colágeno cicatricial producido por la fibrosis hepática.

Como contratinción se utilizó Fast Green para aumentar el contraste. El grado de fibrosis hepática se determinó en cada sección como proporción en porcentaje del área teñida con rojo de picrosirius de toda el área de medición. Los parámetros de la detección colorimétrica videomicroscópica se normalizaron y se mantuvieron constantes en todo el experimento. Se midieron 64 campos de una rejilla normalizada de 31 mm² a un aumento final de 50 veces.

Para cuantificar el grado de transformación de células estrelladas hepáticas (HSC; también células de Ito o células almacenadoras de vitamina A), las células positivas para α -actina de músculo liso se detectaron inmunohistoquímicamente después del tratamiento a corto plazo de ratas con tetraclorometano. El área positiva para α -actina de músculo liso se fijó a un aumento final de 200 veces en cada sección en respectivamente 16 campos centrilobulares de 248 x 180 μ m. La transformación de HSC en células del tipo miofibroblastos productoras de colágeno y de factores de crecimiento es conocida por ser la etapa decisiva en la inducción de fibrosis hepática. Por tanto, las HSC transformadas son un indicador temprano de actividad fibrógena en el hígado.

Para la morfometría semiautomática se utilizó un Leica Quantimed 500MC (Leica Deutschland).

Para la determinación de OH-prolina, en cada caso se secaron 50-100 mg de tejido hepático y se hirvieron con HCl 6 N aproximadamente 17 horas. Después de la evaporación del ácido en la estufa de secado al vacío, el residuo se disolvió con 5 ml de agua destilada y se filtró. Se incubaron 200 μ l de la disolución filtrada con 200 μ l de etanol y 200 μ l de disolución de oxidación (disolución acuosa de cloramina T hidratada al 7% diluida 1 : 4 con tampón de acetato-citrato, pH 6,0) 25 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 400 μ l de reactivo de Ehrlich (12 g de 4-dimetilaminobenzaldehído en 20 ml de etanol + 2,74 ml de ácido sulfúrico concentrado en 20 ml de etanol). Después de 3 horas de incubación a 35°C, la absorción se midió a 573 nm. Para la serie patrón se usaron disoluciones acuosas de OH-prolina (Sigma). El contenido de OH-prolina de las muestras de hígado se calculó en mg por g de peso seco de hígado.

Para seguir la formación de radicales de oxígeno reactivos, se midió la concentración de α -tocoferol (α -TOC) reducido, un capturador de radicales, en el hígado y la actividad de la enzima sensible a radicales 7-etoxiresorufin-deetilasa (EROD) en suero. Ambos parámetros están característicamente regulados por disminución en el envenenamiento con tetraclorometano y permiten una estimación del grado de gravedad de la lesión oxidativa al tejido.

El estado del hígado de los animales se determinó mediante la medición de algunos parámetros habituales del suero:

Alanina-aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), aspartato-aminotransferasa (AST), γ -glutamilttransferasa (GGT), glutamato-deshidrogenasa (GLDH), bilirrubina total (TBIL).

Resultados

El tratamiento con Baypamun® reduce significativamente el grado de degeneración fibrótica de los hígados de ratas tratadas con tetraclorometano (Fig. 1). Además, se observa una inhibición casi completa de la transformación de HSC (Fig. 2). El número de células no parenquimatosas proliferantes en los hígados de animales tratados con Baypamun® está claramente reducido (Fig. 3). Las células no parenquimatosas incluyen HSC y las células de Kupffer que igualmente participan en la fibrogénesis.

Los indicadores de suero para una lesión hepatocelular como ALT, AP, AST, GGT, GLDH y TBIL (Tabla 1) muestran una tendencia a la normalización.

La misma reducción de las concentraciones de EROD y α -tocoferol en el grupo de control y el grupo tratado con Baypamun® demuestran la presencia de radicales de oxígeno reactivos tóxicos debido al envenenamiento con tetraclorometano en ambos grupos (Tabla 1 y 2). Por tanto, puede descartarse un efecto "antifibrótico" de Baypamun® debido a un efecto desintoxicante.

En el modelo de suero, Baypamun® muestra una supresión casi completa de la fibrosis (Fig. 4): tanto el contenido de hidroxiprolina como el área de los hígados que puede teñirse con rojo sirius se encuentra en las ratas tratadas con

ES 2 332 355 T3

Baypamun® casi al nivel de los animales de control sanos, mientras que en el caso de las ratas de control tratadas con suero aumenta varias veces. El aumento del contenido de colágeno inducido por el tratamiento con suero de cerdo asciende en el grupo de Baypamun a sólo el 10% del valor correspondiente en el grupo de control.

5

Ejemplo 2

Parapoxvirus ovis, cepa NZ2

10 Metodología

El virus NZ2 se replicó en pilas de cubetas. Para esto, células BK-clon3A se cultivaron en placas de cultivo celular (37°C) 3 a 5 días en 2 g de EMEM + SBF al 10% hasta que el césped de células tenía una confluencia del 90 al 100%. Se usaron 4 placas de cultivo celular por pila de cubetas como inóculo y se llenaron con medio (2 g de EMEM + SBF al 10%) hasta un volumen de 2,5 litros. Después de 3 a 5 días de incubación a 37°C (césped de células confluyente del 90 al 100%), el medio se cambió por 2 g de EMEM sin adición de suero y el cultivo se infectó con el virus NZ2 (MOI 0,001 a 0,01).

Después de alcanzar el 100% de CPE (incubación 37°C, aproximadamente 7 a 8 días), el virus se cosechó. Para esto, la suspensión de virus se envasó en bolsas estériles de medio y se congeló a -80°C. A continuación, la suspensión se descongeló a 37°C en una cámara de incubación y se liberó de las células mediante una filtración profunda (tamaño de poro 5 µm). A continuación, la suspensión de virus se concentró un factor de 20 a 40 mediante ultrafiltración (punto de corte 100 kDa). Alternativamente, el virus puede concentrarse mediante ultracentrifugación (Ti45 30.000 rpm, 4°C, 60 min).

25

El título alcanzado mediante la concentración del virus contenido en la suspensión se determinó mediante valoración en células BK-clon3A. Después de ajustarse el título de virus a 6,0 mediante medio EMEM sin SBF, el virus se inactivó térmicamente 2 h a 58°C. La inactivación se controló mediante un control de inactivación en células BK-clon3A.

30

Se estudió *Parapox ovis*, cepa NZ2, en ratas en el modelo de fibrosis hepática inducida con suero de cerdo ya usado en el ejemplo 1:

Ratas Sprague Dawley hembra se trataron i.p. 2 x semana con 0,5 ml/animal de suero de cerdo estéril (Sigma), los animales de control con disolución fisiológica estéril de cloruro sódico (2 x semana 0,5 ml/animal i.p.). La cepa NZ2 se administró i.p. 3 x semana en las dosificaciones $1,5 \times 10^5$ ó $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀/animal (volumen de administración: 0,5 ml/animal). Para la dosis más baja, el material de partida se diluyó con medio de cultivo celular (medio mínimo esencial de Eagle ("Minimum Essential Medium Eagle"), Sigma). Los animales de control se trataron con medio de cultivo celular. El tratamiento con la cepa NZ2 se realizó en paralelo al tratamiento con suero, pero nunca el mismo día. Después de 7 semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron, se extrajeron los hígados y la fibrosis hepática se cuantificó tanto morfométricamente como mediante el contenido de OH-prolina. La metodología para esto ya se ha descrito en el ejemplo 1.

45 Resultados

Los resultados de las determinaciones de colágeno se representan en la Fig. 5. De manera sorprendente, el tratamiento con la cepa NZ2 puede suprimir el desarrollo de fibrosis hepática: los animales de control tratados con suero muestran, en comparación con animales sanos, un claro aumento del contenido de OH-prolina y de colágeno que puede teñirse con rojo sirius. Este aumento se reduce por NZ2 en función de la dosis. También es sorprendente el grado del efecto: la dosis 5×10^5 TCID₅₀ reduce el aumento del contenido de colágeno en el hígado hasta menos del 10% del valor de control. Una evaluación cualitativa de los preparados histológicos dio como resultado que la proporción de los animales con septos de colágeno se reduce del 93% (14/15) al 33% (5/15) en el grupo de $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ y al 0% en el grupo de $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀.

55

Ejemplo 3

Efecto antifibrótico de PPVO después de la administración por vía oral

60

El PPVO se formuló como liofilizado seco en cápsulas resistentes a los jugos gástricos (Elanco, Indianápolis, EE.UU.).

Cuatro grupos cada uno de seis animales experimentales se trataron del siguiente modo: un grupo de control (grupo 1) sólo recibió una cápsula resistente a los jugos gástricos (sin PPVO) administrada por vía oral, y adicionalmente disolución estéril de cloruro sódico (0,5 ml/animal) inyectada i.p. En el caso del grupo 2 se administró por vía oral una cápsula resistente a los jugos gástricos (sin PPVO) junto con 0,5 ml de tetraclorometano por animal y 0,5 ml de disolución fisiológica de cloruro sódico inyectada i.p. Los animales del grupo 3 recibieron de nuevo una cápsula

ES 2 332 355 T3

resistente a los jugos gástricos (sin PPVO) junto con 0,5 ml de tetraclorometano/animal administrado por vía oral. Los animales del grupo 3 recibieron además PPVO D1701 (dosis: 5×10^6 TCID₅₀/animal) en 0,5 ml de agua para inyección inyectado i.p. El grupo 4 recibió PPVO D1701 (dosis: 5×10^6 TCID₅₀/animal, formulado en una cápsula resistente a los jugos gástricos) junto con 0,5 ml de tetraclorometano administrado por vía oral. Los animales del grupo 4 recibieron además 0,5 ml de disolución estéril de cloruro sódico inyectada i.p.

Después de 48 horas, se extrajeron los hígados y en secciones de tejido representativas se determinó inmunohistoquímicamente para cada animal el área centrilobular positiva para α -actina de músculo liso (α -SMA) en % del área de medición total (Johnson S J, Hines JE, Burt AD. Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative analysis. Int. J Exp. Path. 1992; 73: 765-772). Este valor es una medida de la transformación de las células estrelladas hepáticas.

Se realizaron 2 series de experimentos según la descripción anterior. Los resultados experimentales de la primera serie de experimentos se reflejan en la Tabla 3, los resultados de la 2ª serie de experimentos en la Tabla 4.

En la serie de experimentos 1, la proporción del área centrilobular positiva para α -SMA en el tejido de hígado de animales a los que se les administró i.p. PPVO D1701 (grupo 3) era inexplicablemente (y en contra del resto de la experiencia experimental) mayor que en animales a los que no se les administró PPVO. Debido a este motivo, la serie de experimentos 2 se realizó como experimento de repetición.

En ambas series de experimentos se verificó idénticamente y sorprendentemente después de la administración por vía oral de PPVO D1701 (respectivamente el grupo 4) una inhibición de aproximadamente el 50% de la transformación en comparación con el grupo de control (respectivamente el grupo 2). En la 2ª serie de experimentos, la inhibición de la transformación después de la administración por vía oral de PPVO D1701 (grupo 4) es de una eficacia similar a la administración peritoneal de PPVO D1701 (grupo 3).

A partir de estos resultados puede deducirse que el PPVO también desarrolla un efecto antifibrótico después de administración por vía oral.

TABLA 1

Influencia de Baypamun® en los parámetros de suero del estado del hígado e indicadores de una intoxicación							
	ALT	AST	AP	GGT	GLDH	TBIL	EROD
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	µmol/l	nmol g x min
Control	49,1	45,7	162,8	0,8	12,5	1,6	0,30
EEM	3,7	8,7	14,76	0,2	7,9	0,2	0,02
Tetraclorometano	95,6	92,4	392,7	6,1	37,1	2,9	0,15
EEM	14,7	14,1	43,0	1,3	14,8	0,3	0,01
T.+ Baypamun®	72,0	65,9	329,5	4,5	18,2	1,9	0,17
EEM	9,9	9,1	26,9	0,8	4,0	0,2	0,03
ALT : Alanina-aminotransferasa				GLDH : Glutamato-deshidrogenasa			
AST : Aspartato-aminotransferasa			TBIL : Bilirrubina total				
AP : Fosfatasa alcalina			EROD : 7-Etoxiresorufin-deetilasa				
GGT : γ -Glutamilttransferasa							

TABLA 2

Influencia de Baypamun®	
sobre α-tocoferol de hígado	
	<i>α-tocoferol nmol / g de tejido</i>
Control	73,1
EEM	2,2
Tetraclorometano	35,7
EEM	2,3
T. + Baypamun®	38,5
EEM	6,1

TABLA 3

Influencia de PPVO después de la administración intraperitoneal o por vía oral sobre la transformación de células estrelladas hepáticas después de la administración de una dosis fibrógena de tetraclorometano. (Serie de experimentos 1)			
Fibrosis	Administración	DOSIS	α-SMA (%)
Grupo 1 Intacto	Cápsula vacía por vía oral + agua para inyección i.p.	----	0,28 \pm 0,04
Grupo 2 Tetraclorometano	Cápsula vacía por vía oral + agua para inyección i.p.	----	2,76 \pm 0,79
Grupo 3 Tetraclorometano	PPVO en agua para inyección i.p. + cápsula vacía por vía oral	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /animal	5,05 \pm 2,00
Grupo 4 Tetraclorometano	PPVO en cápsula por vía oral + agua para inyección i.p.	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /animal	1,46 \pm 0,34

TABLA 4

Influencia de PPVO después de la administración intraperitoneal o por vía oral sobre la transformación de células estrelladas hepáticas después de la administración de una dosis fibrógena de tetraclorometano. (Serie de experimentos 2)			
Fibrosis	Administración	DOSIS	α-SMA (%)
Grupo 1 Intacto	Cápsula vacía por vía oral + agua para inyección i.p.	----	0,20 \pm 0,04
Grupo 2	Cápsula vacía por vía oral + agua	----	3,18 \pm 0,56

ES 2 332 355 T3

	Tetraclorometano	para inyección i.p.		
5	Grupo 3 Tetraclorometano	PPVO en agua para inyección i.p. + cápsula vacía por vía oral	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /animal	1,22 ± 0,35
10	Grupo 4 Tetraclorometano	PPVO en cápsula por vía oral + agua para inyección i.p.	5 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /animal	1,55 ± 0,34

PCT

Original (para PRESENTAR) – impreso el 10.07.2001 01:21:22 PM

20	0-1	Formulario – PCT/RO/134 (EASY) Indicaciones de un microorganismo depositado y/u otro material biológico depositado	
25	0-1-1	creado usando	PCT-EASY versión 2.91 (actualizado el 01.01.2001)
30	0-2	Nº de solicitud internacional	
	0-3	Nº de solicitud del solicitante o mandatario	LEA34714-WO

35	1	Las siguientes indicaciones se refieren al microorganismo y/u otro material biológico que se menciona en la descripción	
40	1-1	Página	5
45	1-2	Línea	11
50	1-3	Indicaciones referentes al depósito	
55	1-3-1	Nombre de la institución de depósito	European Collection of Cell Cultures Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido 10 de julio de 2001 (10.07.2001) ECACC
60	1-3-2	Dirección de la institución de depósito	
	1-3-3	Fecha del depósito	
65	1-3-4	Número de acceso	

ES 2 332 355 T3

	1-4	Otras indicaciones	NINGUNA
5	1-5	Estados designados para los que se facilitan las indicaciones especiales	Todos los estados designados
10	1-6	Indicaciones presentadas por separado Estas indicaciones se transmitirán posteriormente a la oficina internacional	NINGUNA
	PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA ÚNICAMENTE		
20	0-4	Este formulario ha sido recibido con la solicitud internacional (sí)	11 JUL 2001 (11.07.01)
25	0-4-1	Funcionario autorizado	Sabine Aulbers
	PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL ÚNICAMENTE		
30	0-5	Este formulario se recibió la siguiente fecha en la Oficina internacional	15 NOV 2001 (15.11.01)
35	0-5-1	Funcionario autorizado	

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de cepas aisladas del virus Parapox de las cepas orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, o de las cepas New Zealand (NZ) NZ2, NZ7 y NZ10 para la preparación de fármacos con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que se usan tales virus Parapox que se modificaron mediante subcultivo o adaptación a células adecuadas.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que para el subcultivo o la adaptación se usan células humanas como WI-38, MRC-5, células bovinas como BK-K13A47/Reg o MDBK y células ovinas como MDOK.
- 15 4. Uso según una de las reivindicaciones 1 - 3 en combinación con otros agentes para la preparación de fármacos y preparaciones farmacéuticas con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano.
5. Uso de *Parapox ovis* D 1701 solo para la preparación de fármacos y preparaciones farmacéuticas con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano.
- 20 6. Uso de *Parapox ovis* D 1701 o preparaciones de NZ2 como patrón de referencia para la evaluación de efectos antifibróticos en ensayos para descubrir sustancias antifibróticas.
7. Uso de *Parapox ovis* D 1701 según la reivindicación 5, en el que las preparaciones farmacéuticas y los fármacos son adecuados para administración por vía oral.
- 25 8. Uso de una preparación de *Parapoxvirus ovis* químicamente inactivado, cepa D 1701, solo para preparar una preparación farmacéutica con efecto preventivo o curativo sobre fibrosis de órganos del ser humano.

30

35

40

45

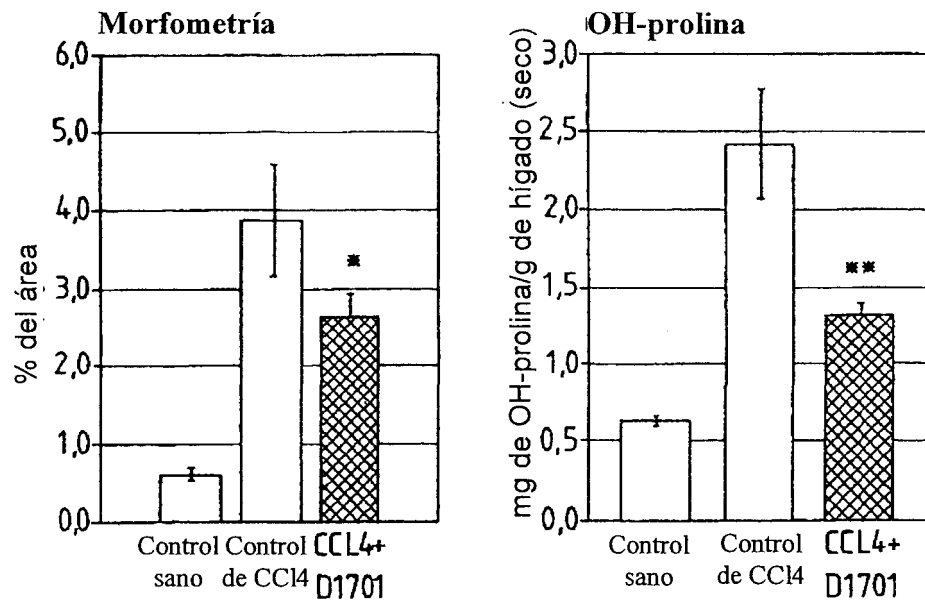
50

55

60

65

Fig. 1



Efecto de PPVO D1701 (Baypamun®) sobre la fibrosis hepática inducida por CCl₄. Dosis 5×10^6 TCID₅₀/animal

Número de animales: n = 6 controles sanos, n = 12 controles de CCl₄, n = 13 CCl₄ + D1701

*p<0,02 **p<0,01 (prueba de Kolmogorow-Smirnow) frente a CCl₄

Fig. 2

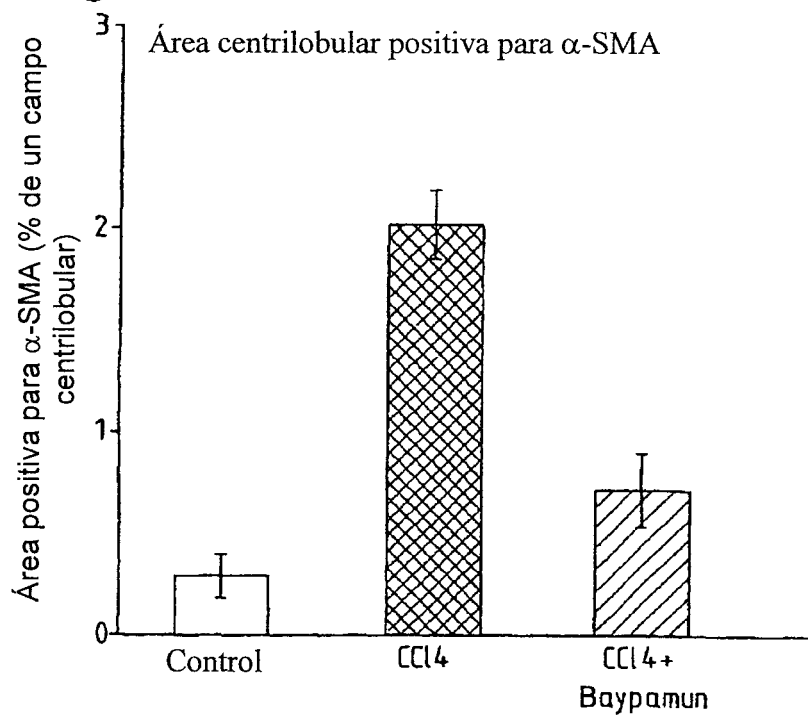


Fig. 3

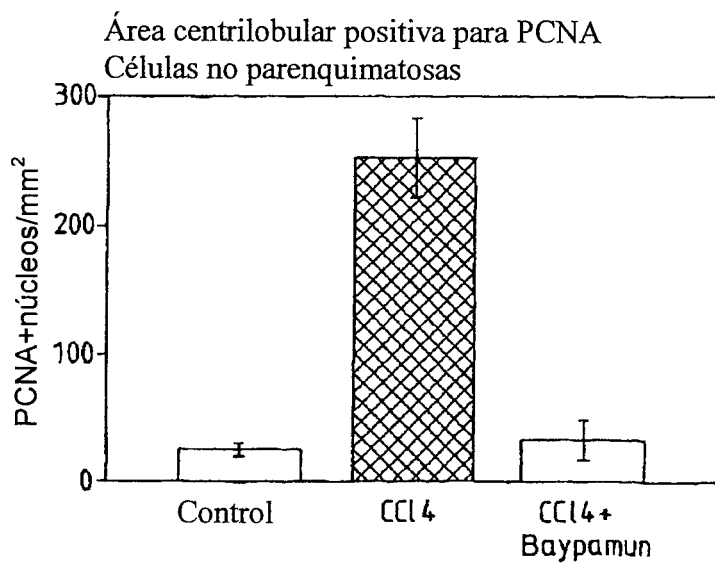
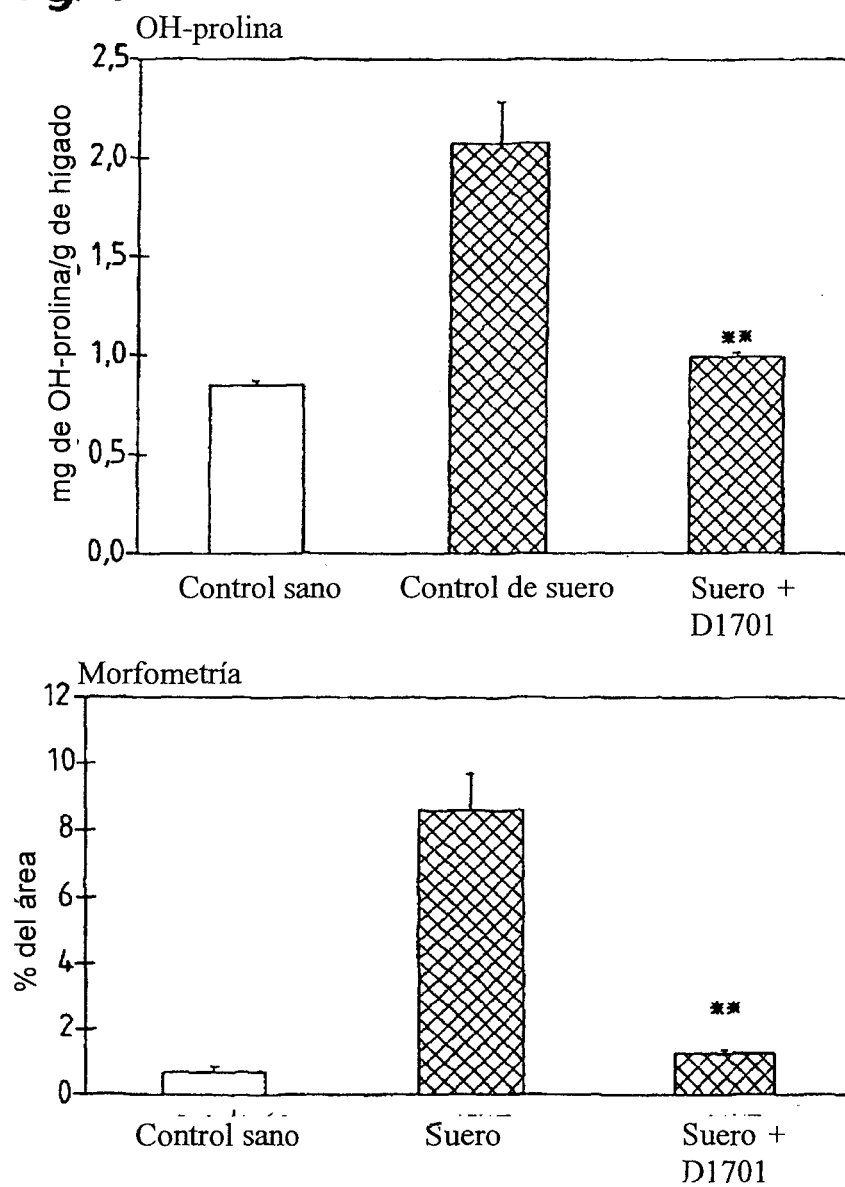


Fig. 4

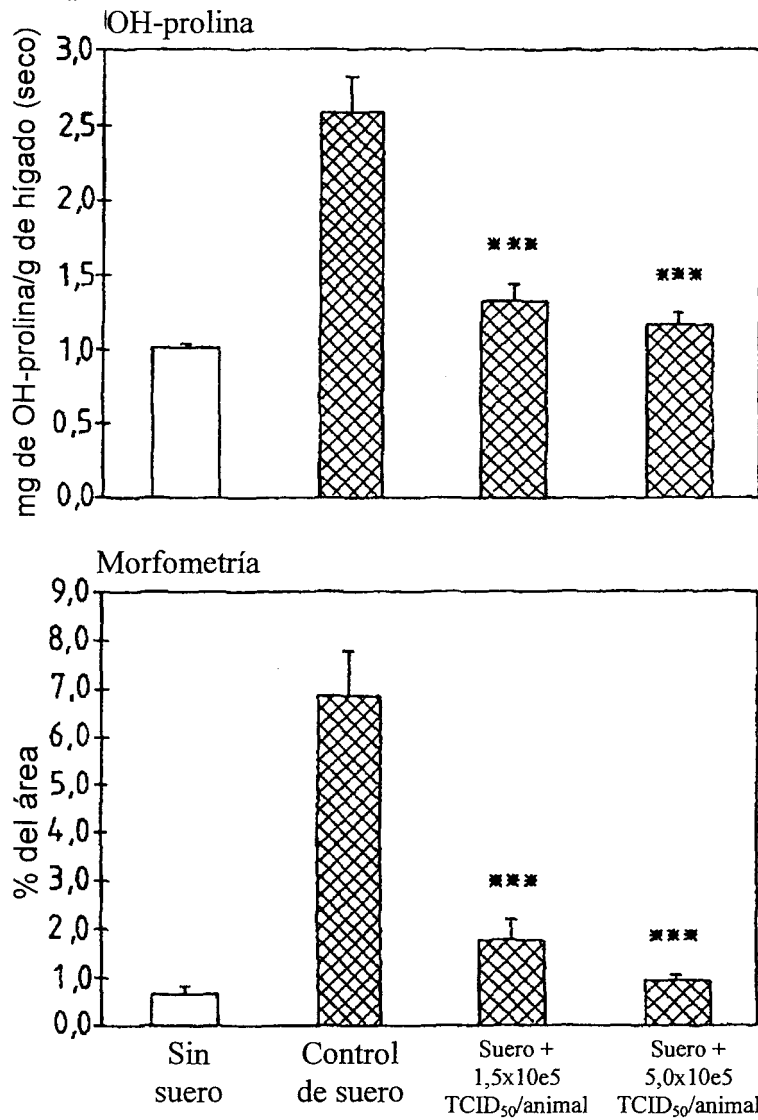


Efecto de PPVO D1701 (Baypamun®) sobre la fibrosis hepática inducida por suero de cerdo. Dosis 5×10^6 TCID₅₀/animal.

Número de animales: n = 15 por grupo de suero, n = 5 controles sanos

**p<0,01 (prueba de Kolmogorow-Smirnow) frente a control de suero

Fig. 5



Efecto de PPVO NZ2 sobre la fibrosis hepática inducida por suero de cerdo.

Número de animales: n = 15 por grupo de suero, n = 5 controles sanos

***p<0,01 (prueba de Kolmogorow-Smirnow) frente a control de suero