

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 536**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61K 31/192** (2006.01)

**A61K 31/216** (2006.01)

**A61K 31/7028** (2006.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08734901 .5**

96 Fecha de presentación: **31.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2129216**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **PREPARACIÓN DE UNA SUSPENSIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS ALMACENABLE VIABLE.**

30 Prioridad:  
**02.04.2007 EP 07006838**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.11.2011**

73 Titular/es:  
**DR. FALK PHARMA GMBH  
LEINENWEBERSTRASSE 5  
79108 FREIBURG, DE**

72 Inventor/es:  
**WILHELM, Rudolf;  
ROEPSTORFF, Allan, Knud y  
KAPEL, Christian, Moliin, Outzen**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 536 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparación de una suspensión de huevos de helmintos almacenable viable

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación para la preparación de suspensiones viables, que pueden ser desarrolladas, que contienen huevos de helmintos parasitarios y que son adecuadas para su uso terapéutico.

La influencia de las infecciones parasitarias sobre la activación del sistema inmunológico de sus huéspedes animales es conocida (Review, D. M. McKay, Parasitology 2006, 132: 1–12). La aparición y el desarrollo de enfermedades del sistema inmunológico se ven influenciados también por esta activación. Estudios epidemiológicos muestran que en regiones con altas tasas de infecciones parasitarias son más raras las enfermedades autoinmunes que en regiones en las cuales, debido a mejores condiciones higiénicas, estas tasas de infecciones son menores. Los perfiles de citocinas de pacientes con la enfermedad de Crohn, una enfermedad intestinal inflamatoria crónica, mostraron que los linfocitos inmunes Th2 pueden ser estimuladas por infecciones por helmintos. La enfermedad de Crohn, una enfermedad autoinmune dominada por Th1 puede ser evitada o influida por una infección por helmintos (Summers et al., Am. J. Gastroenterol. 2003, 98: 2034–2041). También otras enfermedades causadas por linfocitos inmunes Th1, como también la gastritis causada por *Helicobacter* y la encefalomiелitis autoinmunes pueden ser influidas.

Ya en 1973 informó Beer (Parasitology 1973, 67: 253–262), que el *Trichuris suis* podría ser un nematodo adecuado para lograr una inmunización en el ser humano, sin que se produzca una infección patógena por nematodos. El *Trichuris suis* está estrechamente emparentado con *Trichuris trichiura* y sobrevive en el tracto gastrointestinal humano, pero sin embargo, sin multiplicarse. Durante esta infección autolimitada no son necesarias medidas terapéuticas. Una infección por *Trichuris suis* puede provocar por lo tanto una inmunización.

Hunter et al., Aliment. Pharmacol. Ther. 2004, págs. 167–177 describen el uso de helmintos como agentes terapéuticos para enfermedades intestinales inflamatorias. Reddy et al., Parasitol. Res. (2007), págs. 921–927 describen el uso de *Trichuris suis* para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

R. J. S. Beer (Parasitology 1972, 65: 343–350) describe un método para recolectar y purificar huevos de helmintos. Los huevos de helmintos en el estadio embrionario se cultivan en una solución de dicromato de potasio al 0,2% a 32 °C y se airean diariamente. En el documento DE 101 63 115, se describe un método de purificación similar. Los huevos de helmintos se liberan de microorganismos y virus eventualmente presentes con ayuda de reacciones químicas que producen radicales hidroxilo o de oxígeno. Se describe especialmente la así llamada reacción de Fenton. Durante ésta se genera, bajo la influencia de FeCl<sub>2</sub>, a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxígeno en el estado naciente, cuya acción desinfectante se aprovecha.

Boes et al., Veterinary Parasitology (1998), páginas 181–190, describen la embrionación y la infecciosidad de huevos del parásito *Ascaris suum*, que fueron obtenidos de helmintos hembras y se embrionaron en ácido sulfúrico.

Summers y colaboradores (GUT 2005, 54: 87–90) purifican los huevos de *T. suis* igualmente con una solución de dicromato al 0,2% en tampón fosfato a pH 6–7, después que fueron embrionados primero durante 5–6 semanas en una solución tampón que contenía antibióticos (penicilina/ estreptomycin/anfotericina B).

El uso de tales agentes que eliminan las bacterias y virus tiene diversos inconvenientes sustanciales:

Tanto con el uso de una solución de dicromato como también con el uso de una solución de Fenton, ésta tiene que ser retirada después de un corto lapso de tiempo, para evitar que se dañen los huevos de helmintos. Ensayos mostraron además que durante la embrionación que se produce después de la purificación (3 meses a 22°C – 25°C) a pesar de esta purificación anterior, se produce una fuerte proliferación de gérmenes. Tampoco durante el almacenamiento subsiguiente de los huevos embrionados a 2–8 °C puede evitarse una proliferación de gérmenes. Por lo tanto es probable que después de retirar los agentes que eliminan a estos microorganismos y virus, se produzca un nuevo crecimiento de gérmenes en la suspensión de huevos de *T. suis*.

Además, es imprescindible una eliminación completa del dicromato de la solución. Esto es, sin embargo, muy costoso.

La adición de antibióticos para evitar una fuerte proliferación de gérmenes en el estadio de embrionación de los huevos, como describe Summers, si bien evita un fuerte crecimiento de gérmenes en este estadio, no puede eliminar con seguridad los gérmenes. Después de retirar los antibióticos, en los siguientes pasos de purificación y del almacenamiento hasta el uso, se produce nuevamente un fuerte crecimiento de gérmenes.

El documento WO 2007/076868 describe composiciones con huevos de helmintos que fueron tratados con ácido sulfúrico en el intervalo de pH 0 a 2.

Un objetivo de la presente invención es la preparación de una suspensión de huevos de helmintos embrionada, que sea purificada de virus y microorganismos contaminantes, especialmente bacterias, y que pueda ser almacenada sin

que se produzca el crecimiento de esporas de hongos y levaduras. Los procedimientos aquí descritos mantienen la capacidad de los huevos de helmintos a desarrollarse a helmintos adultos. Las suspensiones de huevos de helmintos son adecuadas para un uso terapéutico.

5 En el marco de la presente invención se halló sorprendentemente, que para lograr el objeto descrito es especialmente adecuado un procedimiento de purificación y conservación combinado, ya que para este procedimiento, al contrario de los procedimientos conocidos hasta ahora, no se tienen que usar sustancias tóxicas (por ejemplo, dicromato de potasio,  $K_2Cr_2O_7$ ) y tampoco agentes desinfectantes.

10 Durante el procedimiento de purificación se incuban huevos de helmintos aislados, preferentemente de *T. suis*, en una solución ácida, preferentemente una solución de  $H_2SO_4$ , con un valor de  $pH \leq 2$  durante un período de 1–72 h (véase Ejemplo 1). El período de incubación óptimo es de 2 a 8 horas, preferentemente de 3 horas. La incubación se realiza a una temperatura de 4 °C a 37 °C, preferentemente 25 °C a 35 °C.

15 En el procedimiento para la obtención de un preparado farmacéutico de administración oral que contiene una suspensión de huevos viables de helmintos parasitarios, no patógenos para los humanos, que se pueden almacenar, con el cual después de la ingestión se desarrolla una cantidad suficiente de helmintos, lo que lleva a una estimulación de linfocitos T humanos reguladores, se somete primero la suspensión de los huevos de helmintos en un primer paso a un tratamiento ácido a un valor de  $pH$  de  $\leq 2$ . En otro paso, se eleva el valor del  $pH$  a  $\geq 4$  y se añade un conservante farmacológicamente aceptable. Básicamente también es posible añadir primero el conservante y luego realizar el tratamiento ácido. Se prefiere sin embargo realizar primero el tratamiento ácido y luego añadir el conservante.

20 Preferentemente se realiza el tratamiento ácido por adición de ácido sulfúrico. Durante el tratamiento ácido se añade una cantidad suficiente de ácido para bajar el valor del  $pH$  a un intervalo entre 0,5 y 2. En otra forma de realización se baja el valor del  $pH$  a aprox. 0 hasta  $<1$ . Los ácidos adecuados son ácido clorhídrico, ácido nítrico o preferentemente ácido sulfúrico. El tratamiento ácido deber realizarse sólo durante un período de tiempo relativamente corto, para que no se dañen mucho los huevos de los helmintos. Aquí existe también una relación entre concentración de ácido y duración del tratamiento ácido. Preferentemente, el valor de  $pH$  se baja a menos de 2, más preferentemente incluso a  $pH$  0,6 hasta 0,8. La duración del tratamiento ácido es de algunos minutos hasta pocas horas, preferentemente 120 minutos hasta 360 minutos. El período de tiempo corto aún tolerable comprende el proceso de embrionación de los huevos de helmintos (3 meses a 22 – 25 °C).

30 Después del tratamiento ácido, se eleva nuevamente el valor del  $pH$  por adición de una base adecuada, por ejemplo NaOH, nuevamente a un valor de  $pH > 4$ . A continuación se añaden uno o más conservantes, para lo cual se pueden usar básicamente todas las sustancias adecuadas para la conservación de alimentos o productos farmacéuticos. Preferentemente se usan aquellos conservantes que son bien tolerados justamente por los pacientes que padecen la enfermedad de Crohn.

35 Preferentemente se selecciona el conservante entre el grupo compuesto por ácido sórbico, ácido benzoico, sales de estos ácidos, ésteres del ácido parabenzoico, ésteres del ácido p–hidroxi–benzoico, propilenglicol o combinaciones de estos conservantes.

40 Más preferentemente se usan uno o más de los conservantes seleccionados entre el grupo compuesto por ácido sórbico en una concentración del 0,01 al 0,2%, especialmente 0,1 al 0,2%, ácido benzoico en una concentración del 0,1 al 0,3% en peso, ésteres del ácido p–hidroxi–benzoico en una concentración del 0,02 al 0,3% en peso, propilenglicol en una concentración del 5 al 20% en peso o una combinación de los conservantes mencionados en los intervalos de concentración indicados.

45 Alternativamente a los ácidos fuertes, también son adecuadas soluciones de ácidos más débiles con la adición de los conservantes mencionados, preferentemente ácido sórbico y sus sales, para la rápida inactivación de microorganismos y virus. El uso de estas soluciones tiene sin embargo la ventaja con respecto a los ácidos fuertes de que los huevos de helmintos debido a su valor de  $pH$  menos ácido pueden ser purificados en un solo medio, almacenados embrionados (3 meses a 22 – 25 °C) y usados en el paciente. Este uso a largo plazo no perjudica la viabilidad de los huevos de helmintos (ver el Ejemplo 5). Este procedimiento moderado usa agentes que contienen conservantes con un valor de  $pH$  de  $\geq 1$ , preferentemente  $\leq 2$ , y no conduce a limitaciones con respecto a la pureza microbiológica de las suspensiones de huevos de helmintos.

50 Las suspensiones resultantes que contienen conservantes con huevos de helmintos embrionados son adecuadas para su utilización en pacientes como solución bebible. A estas suspensiones de huevos de helmintos se les pueden añadir eventualmente otros aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como colorantes, saborizantes o espesantes.

55 Objeto de la invención son, por lo tanto, preparados farmacéuticos de administración oral que contienen una suspensión almacenable de huevos viables de helmintos parasitarios, no patógenos para los seres humanos, especialmente *T. suis*, desarrollándose después de la ingestión de la suspensión una cantidad suficiente de helmintos, que lleva a una estimulación de linfocitos T reguladores, y conteniendo la suspensión menos de 1000

microorganismos que forman colonias (cfu = *colony forming unit*) por ml de suspensión. Preferentemente el preparado farmacéutico de administración oral contiene menos de 100 unidades formadoras de colonias de microorganismos por ml de suspensión. Más preferentemente el preparado farmacéutico de administración oral contiene menos de 10 unidades formadoras de colonias de microorganismos por ml de suspensión. El número de las unidades formadoras de colonias se determina con procedimientos microbiológicos usuales.

Por microorganismos se entiende aquí bacterias, virus, hongos, levaduras y protozoos, no debiendo estar presentes aquellos microorganismos que puedan tener efectos perjudiciales para la salud.

Por medio del procedimiento de acuerdo con la invención es posible preparar la suspensión de huevos almacenables de helmintos parasitarios, no patógenos para los seres humanos en una forma que es adecuada para el uso farmacéutico. Mediante el tratamiento de acuerdo con la invención se eliminan por un lado los microorganismos contaminantes, especialmente bacterias, pero también hongos, virus, así como también eventualmente protozoos, de tal modo que el preparado es adecuado para el uso farmacéutico. Por otro lado, el tratamiento es tan cuidadoso que los huevos de los helmintos mantienen su capacidad, después de la ingestión, de crecer en el intestino del paciente, para que se pueda producir la estimulación deseada del sistema inmunológico.

Los preparados de acuerdo con la invención son especialmente adecuados para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, sobre todo enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. De manera especialmente ventajosa se pueden usar los preparados para el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias, que se denominan enfermedad de Crohn.

**Ejemplo 1: Administración de gérmenes en una suspensión de huevos de *T. suis*:**

En una suspensión de huevos de *Trichuris suis* (TSO) en tampón fosfato (pH 7) en una concentración de 2.400 huevos/ml se determinó el número de gérmenes de acuerdo con los datos del DAB (Deutsches Arzneibuch (farmacopea alemana), Capítulo 2.6.12, actualizado por último con la edición complementaria n.º 24 en 2006). Se halló un estado de gérmenes de 190 000 cfu/ml. Esta suspensión se modificó con tampón a pH 2 con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de almacenamiento durante 3 h a 30 °C se redujo el número de gérmenes a < 20 cfu/ml.

Se comprobó luego la calidad del procedimiento presentado. Para ello se usaron cepas de prueba definidas de bacterias, levaduras y hongos de acuerdo con las indicaciones del Deutsches Arzneibuch (DAB). En los Ejemplos 2a, 2b y 2c se representan los resultados de esta prueba.

**Ejemplo 2: Determinación del número de gérmenes**

a. Una suspensión nutritiva correspondiente a DAB 2.6.13 fue inoculada con las bacterias de prueba formadoras de esporas y no formadoras de esporas indicadas en la Tabla 1. A continuación se llevó a pH 2 con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se almacenó durante 6 h a 30°C. La determinación del número de gérmenes subsiguiente dio los valores que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

| Germen   | T <sub>0</sub> | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH después de 6 h |
|--|----------------|--|
| <i>Clostridium sporog.</i>   | 8.000.000      | < 10   |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | 1.400.000      | 20*  |
| <i>Escherichia coli</i>  | 130.000        | < 10   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | 800.000        | <10  |
| <i>Salmonella typhymurium</i>  | 250.000        | < 10   |
| * Mediante un tratamiento más prolongado con ácido durante aprox. 6 a 10 horas se pudo reducir el número de unidades formadoras de colonias a menos de 10. |                |  |

b. Una suspensión nutritiva correspondiente a DAB 2.6.13 se inoculó con las levaduras de prueba indicadas en la Tabla 2. A continuación se llevó con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 2 y/o pH 1 y se almacenó durante 3 h y/o 48 h a 25°C. La determinación subsiguiente dio los valores que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

| Germen  | T <sub>0</sub> | T <sub>3 h</sub>                    | T <sub>48 h</sub> | T <sub>3 h</sub>                    | T <sub>48 h</sub> |
|---|----------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
|   |                | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 2 |                   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 1 |                   |
| <i>Saccharomyces cer.</i>   | 470.000        | 380.000                             | 220.000           | 39.000                              | 40*               |
| <i>Candida albicans</i>   | 690.000        | 380.000                             | 32.000            | 26.000                              | <10               |
| * Mediante un tratamiento más prolongado con ácido hasta una duración de 72 horas se pudo reducir la CfU a 5. |                |                                     |                   |                                     |                   |

- 5 c. Una suspensión nutritiva de acuerdo con DAB 2.6.13 se inoculó con los mohos de prueba indicados en la Tabla 3. A continuación se llevó con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 2, pH 1 y pH 0, y se almacenó durante 3 h y 48 h a 25°C. La determinación subsiguiente dio los valores que se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

| Germen                        | T <sub>0</sub> | T <sub>3 h</sub>                    | T <sub>48 h</sub> | T <sub>3 h</sub>                    | T <sub>48 h</sub> | T <sub>3 h</sub>                    | T <sub>48 h</sub> |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
|                               |                | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 2 |                   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 1 |                   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 0 |                   |
| <i>Penicillium brevicomp.</i> | 490.000        | 90.000                              | 32.000            | 39.000                              | 14.000            | 70                                  | <10               |
| <i>Aspergillus niger</i>      | 800.000        | 370.000                             | 700.000           | 500.000                             | 500.000           | 50                                  | <10               |

Cuando por el tratamiento ácido no se pudo reducir en forma suficiente la CfU para determinados gérmenes, se prolongó la duración del tratamiento ácido correspondientemente hasta 72 horas.

- 10 Los Ejemplos 1 y 2 a–c muestran que después de un corto tiempo las bacterias se pueden eliminar efectivamente con una solución diluida de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 2. Las levaduras y los hongos requieren o bien un tiempo de incubación más prolongado o valores de pH más ácidos para ser eliminados efectivamente.

Los pasos de purificación descritos son sorprendentemente también adecuados para la preparación de una suspensión de huevos de *T. suis* libre de virus.

15 **Ejemplo 3: Desenriquecimiento de virus:**

Inactivación del Virus de la Leucemia Murina (MuLV), el Virus de Pseudorrabia (PRV), el Parvovirus Porcino (PPV) y el Calicivirus Felino (FCV) durante la preparación de la suspensión de huevos de *Trichuris suis* (TSO). Los virus usados son virus modelo.

- 20 El título de virus en las muestras inoculadas se determinó por titulación de punto final. En este procedimiento ya conocido se colocan muestras diluidas sobre placas de microtitulación, que contienen linfocitos indicadores fácilmente identificables. Después de esta infección de los linfocitos indicadores con las muestras que contienen los virus se modifica la morfología de los linfocitos por la lisis celular. Esta lisis celular se puede medir fácilmente bajo el microscopio.

- 25 Los virus ensayados, envueltos y no envueltos, se introdujeron en alta concentración en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N (pH 2, 30 °C) que contenía además TSO. Después de 10 min., 3 h y 72 h se determinó la actividad de los virus. Después de 10 min los virus envueltos PRV y MuLV ya no eran infecciosos, después de 3 h los virus no envueltos FCV y PPV ya no eran infecciosos. El uso de una contraprueba neutralizada con 1 N NaOH mostró también después de 3 h de incubación, que los 4 virus aún eran virulentos. Debido a la citotoxicidad de una solución de dicromato de potasio al 0,2% en ácido sulfúrico 0,01 N no fue posible la prueba de esta solución como comparación.

- 30 Sólo una incubación prolongada y la disminución del valor de pH a un valor de pH de 0, preferentemente <1, posibilitaron una clara reducción también de hongos y levaduras (véase el Ejemplo 2, Tablas 2 y 3). Este nuevo procedimiento de purificación en un medio muy ácido tiene la desventaja de que se perjudica la supervivencia de una suspensión de huevos de helmintos.

5 Como segunda característica de la presente invención, se halló sorprendentemente que por medio de la adición de sustancias químicas usadas para la conservación y tolerables por vía oral se pudo mantener el coeficiente de embrionación. El coeficiente de embrionación es un claro marcador para la supervivencia de las suspensiones de huevos de helmintos. Además el uso de conservantes permitió la inactivación de microorganismos contaminantes ya a pH 4. Como conservantes bien tolerados preferidos se han destacado el ácido benzoico, el ácido sórbico, sus sales y propilenglicol (véase el Ejemplo 4 a–e).

10 Solo la adición de conservantes posibilita el uso de medios sustancialmente menos ácidos y con ello más tolerables para los huevos de helmintos. De esta manera los huevos de helmintos pueden ser purificados, embrionados, almacenados y administrados al paciente en un solo medio. Así se encuentra a disposición un medio para el uso a largo plazo. Se puede evitar una posible recontaminación de las suspensiones TSO con nuevos gérmenes por medio de uso de ácidos diluidos y la adición de conservantes. El crecimiento de nuevos gérmenes se evita por medio del procedimiento combinado descrito de inactivación y conservación de una suspensión de TSO. De este modo este procedimiento tan protector tiene claras ventajas con relación al procedimiento que se basa en el uso de ácidos fuertes.

15 **Ejemplo 4: Determinación del número de colonias de diversos microorganismos**

Aumento del valor de pH de pH 2 a pH 4 y adición de conservantes.

Condiciones de ensayo para los Ejemplos 4a a 4e:

Las muestras de ensayo contenían 10.000 TSO/ml ( $\pm$  10%) cada una en tampón fosfato de pH 4 y o bien 0,2% de ácido benzoico, 0,1% de ácido sórbico o 15% de propilenglicol.

20 A las muestras de ensayo se les añadieron los siguientes gérmenes:

- *Aspergillus niger* como germen individual

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* en combinación.

La temperatura de incubación fue de 25°C. Las placas de ensayo se evaluaron después de 1 a 7 días. Se obtuvieron los siguientes resultados:

| 4 a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |              |               |               |
|-----------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Conservante                       | T 0 (cfu/ml) | T 1d (cfu/ml) | T 7d (cfu/ml) |
| Ácido benzoico 0,2%               | 180.000      | < 10          | < 10          |
| Ácido sórbico 0,1%                | 180.000      | 30            | < 10          |
| Propilenglicol 15%                | 180.000      | 10            | < 10          |
| 4 b <i>Staphylococcus aureus</i>  |              |               |               |
| Conservante                       | T 0 (cfu/ml) | T 1d (cfu/ml) | T 7d (cfu/ml) |
| Ácido benzoico 0,2%               | 130.000      | < 10          | < 10          |
| Ácido sórbico 0,1%                | 130.000      | 240           | < 10          |
| Propilenglicol 15%                | 130.000      | 14.000        | < 10          |
| 4 c <i>Escherichia coli</i>       |              |               |               |
| Conservante                       | T 0 (cfu/ml) | T 1d (cfu/ml) | T 7d (cfu/ml) |
| Ácido benzoico 0,2%               | 140.000      | < 10          | < 10          |
| Ácido sórbico 0,1%                | 140.000      | 490           | < 10          |
| Propilenglicol 15%                | 140.000      | 7.100         | < 10          |
| 4 d <i>Candida albicans</i>       |              |               |               |
| Conservante                       | T 0 (cfu/ml) | T 1d (cfu/ml) | T 7d (cfu/ml) |
| Ácido benzoico 0,2%               | 240.000      | < 10          | < 10          |

|                              |              |               |               |
|------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Ácido sórbico 0,1%           | 240.000      | 190           | < 10          |
| Propilenglicol 15%           | 240.000      | 8.600         | 30            |
| 4 e <i>Aspergillus niger</i> |              |               |               |
| Conservante                  | T 0 (cfu/ml) | T 1d (cfu/ml) | T 7d (cfu/ml) |
| Ácido benzoico 0,2%          | 120.000      | 90            | < 10          |
| Ácido sórbico 0,1%           | 120.000      | 20.000        | < 10          |
| Propilenglicol 15%           | 120.000      | 30.000        | 9.000         |

Cuando existe una fuerte contaminación con hongos, se usan preferentemente ácido sórbico, ácido benzoico y/o ésteres del ácido p-hidroxibenzoico o propilenglicol combinados con estos conservantes.

5 Otra ventaja de la inactivación combinada de microorganismos por medio de ácidos diluidos y el uso de conservantes es que durante el uso subsiguiente de la suspensión de TSO se puede evitar una posible recontaminación con nuevos gérmenes. El crecimiento de nuevos gérmenes se evita mediante el procedimiento combinado descrito de la inactivación y conservación de una suspensión de TSO.

10 La preparación para la elaboración subsiguiente y el uso en el paciente requiere un aumento del valor del pH a un intervalo de pH 2 – 7, preferentemente pH 4 – 6. También para este tercer paso se requiere la adición de conservantes adecuados. Los conservantes a usar tienen que ser adecuados para la administración oral. Han demostrado ser adecuados el ácido sórbico en una concentración de 0,1 – 0,2%, ácido benzoico en una concentración de 0,1 – 0,3%, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico en concentraciones de 0,02 – 0,3%, o propilenglicol en una solución acuosa al 5 – 20%. También son adecuadas las mezclas de los conservantes arriba mencionados.

15 Sorprendentemente se halló que mediante este procedimiento de purificación no se perjudica la viabilidad de la suspensión de huevos de helmintos.

**Ejemplo 5: Viabilidad de los huevos de helmintos**

20 Huevos de helmintos no embrionados en una concentración de 40.000 huevos/ml fueron suspendidos en distintos medios y embrionados (22 – 25 °C). Después de un período de incubación de 60 y 90 días se examinaron las suspensiones individuales con el microscopio y se calculó el coeficiente de embrionación a partir del número total de huevos de helmintos así como también el número de huevos de helmintos morfológicamente intactos y embrionados. El coeficiente de embrionación (CE) es un indicador para la viabilidad de los huevos de helmintos. Al comienzo de la embrionación se encuentran presentes sólo huevos de helmintos no embrionados, de modo que el coeficiente es cero. Aumenta durante el período de embrionación y alcanza a partir del día 60 su máximo bajo las condiciones de incubación elegidas. En general se alcanzan valores de alrededor de 90%.

| Medio de suspensión                             | CE Día 0 | CE Día 60 | CE Día 90 |
|---|----------|-----------|-----------|
| Ácido sulfúrico pH sorbato de potasio 1 + 0,01% | 0        | 0,91      | 0,91      |
| Ácido sulfúrico pH sorbato de potasio 1 + 0,07% | 0        | 0,93      | 0,91      |
| Ácido sulfúrico pH 0,8                          | 0        | 0,94      | 0,90      |
| Ácido sulfúrico pH 0,5                          | 0        | 0,92      | 0,77      |

30 Para todos los medios se pudo hallar después de un período de embrionación de 60 días una proporción de huevos embrionados de más de 90%. Mientras que los medios que contenían conservantes, independientemente de la concentración de los conservantes, no mostraron disminución del coeficiente de embrionación después de otros 30 días, con el ácido sulfúrico a pH 0,5 se observó una disminución de la proporción de huevos de helmintos embrionados. La adición de conservantes oralmente aceptables, preferentemente ácido sórbico y sus sales, permite por lo tanto el uso de valores de pH que no perjudican los huevos de helmintos. Este procedimiento puede ser usado por lo tanto para la elaboración de un preparado adecuado para un almacenamiento estable (procedimiento protector).

35 La preparación para la elaboración subsiguiente requiere un aumento del valor del pH a un intervalo de pH 2 – 7, preferentemente pH 4–6, así como también la adición de conservantes adecuados. Los conservantes a usar tienen

## ES 2 368 536 T3

que ser adecuados para el uso oral. Han demostrado ser adecuados aquí el ácido sórbico en una concentración de 0,01 – 0,2%, ácido benzoico en una concentración de 0,1 – 0,3%, o propilenglicol en una solución acuosa al 5 – 20%. También son adecuadas las mezclas de los conservantes arriba mencionados.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la preparación de un preparado farmacéutico para administración oral que contiene una suspensión almacenable de huevos viables de helmintos parasitarios, no patógenos para los seres humanos, a saber, de *Trichuris suis*, con el que, después de la ingestión de la suspensión, se desarrolla un número suficiente de helmintos, lo que produce una estimulación de linfocitos T humanos reguladores, caracterizado porque la suspensión de los huevos de helmintos, en un paso, es sometida a un tratamiento ácido a un valor de pH de  $\leq 2$  y porque, en otro paso, se ajusta el valor del pH a  $\geq 4$  y se añade un conservante farmacológicamente aceptable.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el tratamiento ácido se realiza por adición de ácido sulfúrico.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el conservante se selecciona entre el grupo compuesto por ácido sórbico, ácido benzoico, sales de estos ácidos, ésteres del ácido p-benzoico, propilenglicol o una combinación de estos conservantes.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque se añaden uno o más de los conservantes seleccionados entre el grupo compuesto por ácido sórbico en una concentración del 0,01 al 0,2% en peso, ácido benzoico en una concentración del 0,1 al 0,3% en peso, ésteres del ácido p-hidroxi-benzoico en una concentración del 0,02 al 0,3% en peso, propilenglicol en una concentración del 5 al 20% en peso, o una combinación de los conservantes mencionados en los intervalos de concentración indicados.
5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se añaden a la suspensión eventualmente otros aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 20 6. Preparado farmacéutico de administración oral que contiene una suspensión almacenable de huevos viables de helmintos parasitarios, no patógenos para los seres humanos, a saber *Trichuris suis*, con el que, después de la ingestión de la suspensión se desarrolla un número suficiente de helmintos, lo que produce una estimulación de linfocitos T reguladores, conteniendo la suspensión menos de 1000 microorganismos formadores de colonias por ml de suspensión, caracterizado porque se prepara de acuerdo con uno de los procedimientos de acuerdo con la reivindicación 1 a 5.
- 25 7. Preparado farmacéutico de administración oral de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la suspensión contiene menos de 100 unidades formadoras de colonias de microorganismos por ml de suspensión.
8. Preparado farmacéutico para administración oral de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque la suspensión contiene menos de 10 unidades formadoras de colonias de microorganismos por ml de suspensión.
- 30 9. Preparado farmacéutico para administración oral de acuerdo con la reivindicación 6 a 8, caracterizado porque los microorganismos son elegidos entre el grupo compuesto por bacterias, virus, hongos, levaduras y protozoos.
10. Uso de una suspensión almacenable de huevos de helmintos parasitarios, a saber, de *Trichuris suis*, preparada de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un preparado farmacéutico para el tratamiento de enfermedades intestinales inflamatorias, especialmente enfermedades intestinales inflamatorias crónicas.
- 35 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque la enfermedad intestinal inflamatoria es la enfermedad de Crohn.