

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 127**

51 Int. Cl.:

A61K 35/56 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2006 PCT/DK2006/000751**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2007 WO07076868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006 E 06828771 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 1968618**

54 Título: **Composición que comprende huevos de parásitos y métodos para aislamiento y almacenamiento de huevos de parásitos**

30 Prioridad:

30.12.2005 DK 200501858

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.10.2017

73 Titular/es:

**PARASITE TECHNOLOGIES A/S (100.0%)
VALLEROD BANEVEJ 12
2960 RUNGSTED KYST, DK**

72 Inventor/es:

**KAPEL, CHRISTIAN MOLLIN OUTZEN;
ROEPSTORFF, ALLAN y
THAMSBORG, STIG MILAN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 635 127 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

Composición que comprende huevos de parásitos y métodos para aislamiento y almacenamiento de huevos de parásitos

5

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con métodos para aislamiento y almacenamiento de huevos de *Trichuris suis*. La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier materia objeto identificada en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que excede el alcance de la invención que se representa por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada pero solo sirve como información de antecedentes para entender mejor la invención.

10

Antecedentes

15

Los huevos de *Trichuris suis* (TSO) es la materia prima de un ingrediente farmacéutico activo, destinado para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o alérgicas.

20

El uso de material de parásitos para el tratamiento médico de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) se describe por ejemplo en el documento US 6,764,838 y corresponde al documento WO 99/33479, en el que se divulga un método alternativo adecuado para aislamiento y almacenamiento de huevos embrionados de *Trichuris suis* hasta un año.

25

El artículo "Inactivation of Viable Ascaris Eggs by Reagents during Enumeration", K. L. Nelson y J. L. Darby, Applied Environmental Microbiology, vol. 67, no. 12, 1 de diciembre de 2001, páginas 5453-5459, divulga diferentes métodos para inactivar los huevos de *Ascaris*. El artículo también divulga un método adecuado para aislamiento de huevos de *Ascaris*.

30

La causa de la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) parece implicar factores tanto genéticos como ambientales. Las teorías actuales sugieren que la IBD resulta de una respuesta inmunológica anormal a bacterias intestinales, iniciadas por causas desconocidas. La IBD es común en los países industrializados donde la colonización por helmintos es rara. Por el contrario, es poco frecuente en las regiones del mundo donde la mayoría de la gente tiene gusanos. Los helmintos podrían ser beneficiosos en muchas enfermedades autoinmunitarias o alérgicas debido a su capacidad única para disminuir la respuesta inmunitaria hiperreactiva. En apoyo de esta idea, los helmintos reducen la inflamación intestinal en ratones y el hombre.

35

Los miembros del género helmintos *Trichuris* son gusanos redondos intestinales (tricocéfalos) con características favorables para uso terapéutico. El *Trichuris suis*, el tricocéfalo porcino, está genéticamente relacionado con *Trichuris trichiura*, el tricocéfalo humano, pero se ha demostrado experimentalmente que coloniza los humanos sólo brevemente sin provocar enfermedad. Los óvulos de *T. suis* se pueden producir utilizando cerdos libres de patógenos específicos, es decir, cerdos libres de infecciones con patógenos especificados, y se procesan para asegurar ausencia de contaminantes biológicos.

40

Para cualquier producción de TSO existen tolerancias estrictas con respecto a la contaminación de partículas y la actividad microbiana de la solución utilizada como un medio:

45

1) El proceso de aislamiento debe garantizar una contaminación de partículas de solución más allá de 2% o 1% contado como números.

50

2) El proceso de aislamiento debe garantizar que se eliminan otros huevos de parásitos.

3) El perfil microbiano debe cumplir con los requisitos para una administración oral que contenga materia prima de origen natural en la categoría 3B de la Farmacopea Europea.

55

4) Los medios utilizados para almacenamiento deben permitir el desarrollo del óvulo desde huevos no embrionados (no infecciosos) a huevos embrionados (infecciosos).

5) Los medios preferiblemente no deben contener antibióticos u otros productos químicos, lo que puede provocar reacciones alérgicas en el paciente potencial.

60

6) Los medios utilizados para almacenamiento deben permitir además el almacenamiento a largo plazo (3-5 años) sin afectar la infectividad del TSO para facilitar una vida útil prolongada de un producto medicinal.

7) El método debe ser aplicable para recuperación de alta cantidad de huevos.

65

Descripción de la invención

Parásitos de helmintos

5 En la definición de un parásito de helmintos, existen dos grupos. El primer grupo es parásitos de helmintos que colonizan naturalmente anfitriones mamíferos específicos, incluidos los humanos, y el segundo grupo es parásitos de helmintos que no colonizan con éxito especies de mamíferos específicas, incluido el hombre, pero pueden brindar protección a un individuo si se infectan, debido a la estimulación del sistema inmunitario.

10 En el primer grupo, los parásitos de helmintos son gusanos multicelulares con ciclos de vida complejos y desarrollo ajustados a las especies de mamíferos específicas. Los nematodos (gusanos redondos no segmentados) y los platelmintos (gusanos planos) son dos grupos de helmintos que pueden colonizar los intestinos humanos. De acuerdo con la presente invención, uno cualquiera de una serie de parásitos de helmintos que colonizan naturalmente humanos o animales proporcionará los resultados deseados.

15 Los nematodos que con frecuencia habitan en el intestino humano son *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (gusano alfiler), *Trichuris trichiura* (tricocéfalo), *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (lombrices) y *Strongyloides stercoralis*. El *Trichinella spiralis* infesta el intestino delgado brevemente, pero es raro.

20 Los platelmintos incluyen trematodos y cestodos. Los trematodos adultos más comunes que residen en los intestinos humanos son las especies *Fasciolopsis*, *Echinostoma* y *Heterophyes*. Aquellos que viven en el sistema biliar incluyen *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus* y *Fasciola hepatica* y *gigantica*. Los *Schistosoma* habitan en el sistema venoso, pero varias especies afectan crónicamente el intestino por el paso de los huevos a través de la pared intestinal. Los cestodos adultos que comúnmente infectan a los humanos son especies de *tenia* *Diphyllobothrium* (pescado), *Taenia saginata* (tenia bovina), *Taenia solium* (tenia del cerdo) y *Hymenolepis diminuta* y *H.nana* (tenia enana).

Otros helmintos de interés incluyen los parásitos filarias y los trematodos pulmonares. Estos no tienen una fase intestinal, pero estimulan una fuerte respuesta inmunitaria (tipo Th2).

30 El segundo grupo general de parásitos de helmintos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen helmintos que normalmente no colonizan especies de mamífero especificadas, que incluyen el hombre, sino que se puede permitir la protección contra enfermedades que incluyen alergias que se caracterizan por una respuesta inmunitaria "tipo Th1". Estos incluyen *Trichuris muris* (tricocéfalo de ratón), *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Hymenolepis nana*, todos los cuales son helmintos intestinales infecciosos a los ratones. Los helmintos *Trichuris suis* y *Ascaris suum* son helmintos de cerdos que pueden infectar a los humanos. La especie *Toxocara* de *Trichuris vulpis*, la especie *Toxascaris*, especie *Gnathostoma*, y especie *Ancylostoma* son helmintos de perros o gatos que también puede infectar a los humanos. *Anisakis* y *Pseudoterranova* son los nematodos de los mamíferos marinos que se pueden transmitir a los humanos. Los esquistosomas de aves pueden infectar a los humanos de forma transitoria. Dichos esquistosomas incluyen *S. douthitti*, *ocellata* *Trichobilharzia*, *T. stagnicolae*, *T. physellae*, y *Gigantobilharzia huronensis*.

Enfermedades tratables relevantes para la invención

45 A. Enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn, CD, y colitis ulcerosa, UC):

Los datos epidemiológicos sugieren la susceptibilidad genética al desarrollo de la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (CU). La incidencia de CD en las sociedades industrializadas ha aumentado desde la década de 1950 y ahora es desde 1 hasta 8 por cada 100.000 personas por año. Esto sugiere que los cambios desconocidos en nuestro entorno han afectado a la frecuencia de CD.

50 Si bien la causa de IBD permanece indeterminada, se presume que el resultado de desregulación del sistema inmunitario de la mucosa intestinal. Las células inflamatorias en la mucosa normalmente nos protegen del contenido luminal. Esta inflamación crónica altamente efectiva está estrechamente controlada para limitar la lesión al tejido. La IBD puede resultar de respuestas inmunitarias inapropiadas vigorosas a factores luminales. La CD parece ser una inflamación de tipo Th1 excesivamente vigorosa que produce IFN-gama y TNF-alfa. La naturaleza de UC está menos definida.

60 Existen diversos modelos de animales de inflamación intestinal crónica. Un avance importante es el reciente descubrimiento de que algunos ratones con supresiones de genes mediante ingeniería genética pueden desarrollar inflamación intestinal crónica similar a la IBD. Estos incluyen ratones mutantes que llevan supresiones específicas para los genes IL-2, IL-10, MHC clase II o genes TCR entre otros. El uso de algunos de estos modelos ha mostrado que un sistema inmunitario desregulado en sí mismo puede mediar la lesión intestinal. La inflamación de la mucosa de diversos de estos modelos genera grandes cantidades de IFN-gamma y TNF-alfa que sugieren que el exceso de producción de citoquinas tipo Th1 es un mecanismo común que subyace en la patogénesis de la enfermedad. También, los circuitos Th1 de bloqueo evitan la inflamación. La CD también se caracteriza por una alta respuesta

Th1. Por lo tanto, estos modelos pueden tener implicaciones directas en cuanto a la comprensión de la inmunopatología de este proceso de enfermedad humana.

5 B. Artritis reumatoide (RA):

10 La RA es una enfermedad crónica que se caracteriza por sinovitis inflamatoria persistente, usualmente incluye articulaciones periféricas en una distribución simétrica. Esta inflamación puede dar lugar a erosiones óseas, daño del cartílago y destrucción articular. Es una enfermedad que tiene aproximadamente el 1% de la población. La prevalencia aumenta con la edad, y las mujeres se ven afectadas con mayor frecuencia que los hombres. La propagación de la AR es un evento mediado inmunológicamente impulsado por las células CD4 + Th1 (hipersensibilidad de tipo III).

15 C. Diabetes mellitus juvenil dependiente de insulina (DM) (tipo 1):

20 La DM tipo 1 es una enfermedad que por lo general comienza en la edad adulta temprana y que resulta de la incapacidad de producir insulina en respuesta a una concentración aumentada de azúcar en la sangre. La carencia de insulina resulta en niveles de azúcar persistentes altos en la sangre e incapacidad para metabolizar adecuadamente la glucosa lo que provoca trastornos metabólicos que eventualmente dañan los ojos, riñones, corazón y otros órganos. Tomando insulina de forma parenteral se puede controlar parcialmente estos problemas metabólicos. La DM Tipo 1 resulta de un ataque autoinmunitario sobre las células beta pancreáticas, que son la fuente de insulina. Los macrófagos activados y células T citotóxicas rodean y destruyen las células beta del páncreas. La susceptibilidad genética y los eventos ambientales mal definidos desencadenan el proceso de la enfermedad.

25 D. Lupus Eritematoso (LE):

30 El LE es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que es más frecuente en las mujeres en la edad adulta temprana a media. El daño de tejidos es causado por autoanticuerpos y células T reguladoras hiperreactivas. La respuesta inmunitaria anormal permite la producción sostenida de autoanticuerpos patógenos y complejos inmunitarios, probablemente relacionados con la hipersensibilidad de tipo III. Esto conduce a daños en tejidos musculoesqueléticos, cutáneos, hematológicos, renales y otros sistemas de tejidos. La respuesta inmunitaria anormal, probablemente depende de la interacción de múltiples factores hereditarios y ambientales.

35 E. Sarcoidosis:

40 La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa crónica de los pulmones y otros órganos de causa desconocida. La mayoría de los pacientes la presenta entre las edades de 20 a 40 años. El síntoma más frecuente es la falta de aire. La enfermedad resulta de una respuesta inmunitaria celular de tipo Th1, probablemente para un número limitado de antígenos. La sarcoidosis se desarrolla en todo el mundo y afecta a todas las razas. Sin embargo, es notable la diversidad de la prevalencia de la sarcoidosis entre ciertos grupos étnicos y raciales. Por ejemplo, la enfermedad es rara en Polonia, el sudeste de Asia e India.

45 F. Esclerosis múltiple (MS):

50 La MS es un trastorno inflamatorio crónico recidivante, multifocal del sistema nervioso central que conduce a la desmielinización focal y cicatrización del cerebro. Es una enfermedad frecuente que afecta aproximadamente a 1 millón de personas en el mundo occidental y que a menudo comienza durante la primera edad adulta hasta la edad adulta media. La MS es una enfermedad autoinmunitaria mediada por lo menos en parte por células Th1. Las lesiones de MS se parecen a aquellas inducidas por las respuestas de hipersensibilidad retardada que contienen células T y macrófagos activados. Es una enfermedad de climas templados, que aumenta en prevalencia con la distancia desde el ecuador.

55 G. Psoriasis

60 La psoriasis es una dermatitis crónica recidivante, que se puede encontrar en el 2-3% de la población de las comunidades occidentales. La enfermedad se diagnostica normalmente por primera vez en individuos de 10 a 30 de edad y se asocia con respuestas inmunitarias aberrantes. La respuesta inmunitaria anormal depende probablemente de factores hereditarios múltiples y ambientales mal definidos.

65 H. Autismo

El autismo se caracteriza por las desviaciones conductuales y de desarrollo que resultan en un pobre rendimiento social. El autismo se puede encontrar en hasta el 1% de la población; sin embargo, la incidencia está aumentando constantemente. La etiología es desconocida, pero existe un fuerte componente genético, y la enfermedad es particularmente común en las familias con predisposición a trastornos autoinmunitarios, y por lo tanto puede estar implicada la autoinmunidad.

I. Alergia

En cuanto a las enfermedades autoinmunitarias clásicas (tales como las enfermedades mencionadas anteriormente), la relevancia de la infección por helmintos para modificar las respuestas inmunitarias hiperreactivas en fenotipos de la enfermedad alérgica (por ejemplo, enfermedades de hipersensibilidad de tipo I como atopía, alergia a alimentos, asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica) se deben considerar en el contexto de la hipótesis de la higiene. La incidencia de estas enfermedades están aumentando constantemente en el mundo industrializado, con un alto nivel de higiene y saneamiento. Los estudios de observación sobre las exposiciones microbianas han reportado más consistentemente que la infección particularmente de helmintos se asocia con un riesgo reducido de atopía y enfermedades alérgicas. En general, la infección por helmintos se presenta con un alto nivel de anticuerpo IgE en el suero de lo contrario sólo se ve en la enfermedad alérgica. Sin embargo, en personas alérgicas, el IgE contra, por ejemplo polen provoca inflamación alérgica debido a la activación de mastocitos y desgranulación con síntomas inmediatos asociados (por ejemplo, inflamaciones, estornudos y lagrimeo), mientras que la infección por helmintos es a menudo asintomática debido a un estado de hiporreactividad helmintos. La infección con diferentes especies de helmintos (por ejemplo, esquistosomas y ancilóstomos) se ha asociado con un riesgo reducido de atopía, lo que sugiere un mecanismo biológico común. El estado de hiporreactividad durante la infección por helmintos presenta características inmunológicas, que son similares a aquellas observadas durante la terapia inmunitaria alérgica efectiva para la rinitis alérgica, que incluyen la producción de citoquina IL-10, y IgG4 específica antígenos/alérgenos. Ambas reacciones alérgicas y la infección por helmintos se caracterizan por un denominado perfil de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Sin embargo, durante la infección crónica por helmintos este perfil es modificado por las citocinas IL-10 y TGF β que se consideran tienen propiedades reguladoras antiinflamatorias. Los modelos murinos de infección por helmintos y las enfermedades alérgicas apoyan las observaciones anteriores en humanos.

Los estudios de observación se han enfocado principalmente en la relación entre el asma y los helmintos, y estos estudios sugieren además que la reducción observada en el riesgo de asma podría ser más fuerte para la infección con especies de helmintos con una fase sistémica en su anfitrión humano, y/o al reforzarse con el aumento de la intensidad de la infección medida por el número de huevos en las heces. Actualmente, se considera que los helmintos o sus productos de excreción llevan moléculas de firma que son particularmente adecuadas para la inducción natural de una red de regulación antiinflamatoria robusta que podría prevenir o aliviar los síntomas de la enfermedad alérgica. La evidencia de una relación causa-efecto directa entre la infección por helmintos y riesgo reducido de enfermedad alérgica ha sido sugerido por estudios que muestran que el tratamiento anti-gusano en áreas endémicas elimina de forma efectiva las altas cargas de gusanos pero dicho tratamiento se asocia temporalmente con un aumento de las reacciones cutáneas positivas a alérgenos (atopía).

La aparición de los complejos de las enfermedades anteriormente mencionadas (A - G) tiene que un grado variable descrito en los animales domésticos, aunque los antecedentes y la manifestación clínica pueden ser diferentes de la enfermedad equivalente en los humanos. Sin embargo, existe una fuerte razón para considerar que estas enfermedades en los animales también son relevantes tratables para la invención.

Se requiere evidencia de las enfermedades autoinmunitarias y alérgicas anteriormente mencionadas – así como también la cura o mejora de las mismas - para determinar la necesidad de tratamiento y para monitorizar el progreso del tratamiento. Los siguientes procedimientos se pueden utilizar para medir los parámetros clínicos de las enfermedades mencionadas anteriormente en el hombre.

1. Enfermedad Inflamatoria del intestino (IBD)

Evaluación de la inflamación: En ratones, la evidencia clínica de la enfermedad incluye la pérdida de peso, diarrea, prolapso rectal y evidencia histológica de la inflamación intestinal. Por lo tanto, la mejora en estos parámetros significaría mejora de la enfermedad.

Para estratificar la inflamación intestinal en modelos animales, se retira el tejido, se enrolla con la técnica de enrollado Suizo se incorpora en parafina de acuerdo con métodos estándar. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. El grado de inflamación del colon se clasifica semi-cuantitativamente de 0 a 4 de una manera ciega por un único patólogo utilizando una técnica estandarizada: 0 = sin inflamación; 1 = inflamación de bajo nivel; 2 = inflamación de nivel intermedio; 3 = inflamación de alto nivel con engrosamiento de la pared; y 4 = infiltración transmural, y pérdida de células caliciformes con engrosamiento de la pared.

Para contar los mastocitos, las muestras de tejido intestinal de los ratones individuales se preparan mediante la técnica de enrollado Suizo, se fijan en fijador de Carnoy, se incorporan en parafina y se procesan para tinción con azul Alcian y safranina. Cincuenta campos adyacentes de una sección dada se escanean para mastocitos de la mucosa en las capas de lámina propia y musculares. Los mastocitos se identifican por su distintiva tinción granular intracelular con azul Alcian. Todas las muestras se evaluaron a ciegas.

La actividad de la enfermedad en los humanos se monitoriza utilizando diversos criterios clínicos, de laboratorio e histológicos. Existen diversos índices de actividad de la enfermedad IBD bien establecidos que monitorizan los

parámetros clínicos como la frecuencia de la diarrea y dolor abdominal. Un índice particularmente útil para la evaluación de la enfermedad de Crohn es el Índice de Actividad de la Enfermedad de Crohn o CDAI. El CDAI incorpora 8 variables relacionadas con la actividad de la enfermedad y se ha utilizado en la mayoría de los estudios recientes de agentes terapéuticos en la enfermedad de Crohn. Incluye el número de deposiciones líquidas o muy blandas, la gravedad del dolor o calambres abdominales, el bienestar general, la presencia de las manifestaciones extraintestinales de la enfermedad, la presencia o ausencia de una masa abdominal, el uso de fármacos antidiarreicos, hematocrito, y el peso corporal. Los rangos de puntuación compuesta de 0 a aproximadamente 600. Las puntuaciones inferiores a 150 indican remisión y puntuaciones por encima de 450 indican una enfermedad grave.

Un cuestionario de vida o de calidad específica a enfermedad probado y aceptado también se puede administrar antes de y después del tratamiento para evaluar el progreso terapéutico. El Cuestionario de enfermedad inflamatoria del intestino Irvine es un cuestionario de 32 ítems. Se evalúa la calidad de vida con respecto a la función del intestino (por ejemplo, heces blandas y dolor abdominal), síntomas sistémicos (fatiga y patrón de sueño alterado), función social (asistencia en obras y la necesidad de cancelar eventos sociales) y el estado emocional (enojado, deprimido, o irritable). La puntuación varía entre 32 a 224, las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida. Los pacientes en remisión por lo general tienen puntuación entre 170 y 190.

También, son útiles los rayos X, endoscópicos, y la evaluación histológica de la actividad de la enfermedad intestinal. Los niveles de proteína C reactiva y la tasa de sedimentación de glóbulos también se pueden monitorizar como indicadores sistémicos de la inflamación.

2. Artritis reumatoide

Evaluación de la inflamación: Para los ratones con artritis inducida por colágeno, los ratones se examinan cada dos días y sus patas se puntúan como sigue: 0, normal; 1, eritema y tumefacción leve confinada a la articulación del tobillo o dedos de los pies; 2, Eritema y leve hinchazón que se extiende desde el tobillo hasta la parte media del pie; 3, eritema y tumefacción severa que se extiende desde el tobillo hasta las articulaciones de los metatarsianos; y 4, deformación anquilosante con hinchazón de las articulaciones. Estas puntuaciones de artritis se pueden correlacionar con los cambios histológicos en las articulaciones artríticas. El éxito del tratamiento resulta en una disminución de la puntuación de la artritis con una mejora en la histología.

Para la artritis inducida por pristano, las articulaciones se pueden medir con un micrómetro para detectar la inflamación. En humanos, la RA se puntúa al medir la hinchazón de las articulaciones, eritema, limitación de movilidad y dolor. Adicionalmente, el fluido sinovial se puede analizar para citoquinas y las concentraciones de proteínas inflamatorias, y para la composición y función de los leucocitos, según los métodos conocidos en la técnica. Las biopsias sinoviales proporcionan tejido para el análisis histológico de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

3. Lupus eritematoso

Evaluación de la inflamación: El desarrollo y la función normal del sistema inmunitario depende críticamente de la eliminación de las células no deseadas mediante un proceso denominado apoptosis. Las interacciones de célula a célula a través de moléculas de superficie celular específicas y sus receptores con frecuencia desencadenan el proceso. Uno de dichos sistemas se llama FAS y ligando FAS. Los ratones deficientes en cualquiera de FAS (ratones LPR-I) o ligando FAS (ratones GLD-I) desarrollan una enfermedad autoinmunitaria como el lupus.

Las colonias de ratones LPR o GLD se mantienen en unidades de vivienda microaisladas bajo condiciones libres de patógenos específicos. Estos ratones pueden desarrollar la autoinmunidad espontáneamente, pero más predecible después de inducción artificial. Para inducir la enfermedad, a los ratones de 8 semanas de edad se les inyecta un agente como pristano. Al cabo de dos meses, los ratones tienen la enfermedad autoinmunitaria. Se conocen bien en la técnica muchos criterios clínicos, histológicos e inmunológicos útiles para juzgar la inducción de la enfermedad y mejora tanto en ratones como humanos.

4. Diabetes mellitus dependiente de insulina juvenil (Tipo 1)

Evaluación de la inflamación: El ratón NOD desarrolla diabetes mellitus tipo 1 similar a los humanos debido a la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. El examen clínico, bioquímico, inmunológico e histológico de acuerdo con métodos conocidos en la técnica permite la evaluación de la inducción de la enfermedad y la mejora en los ratones.

5. Sarcoidosis

Evaluación de la inflamación: En el modelo de embolización de microesfera de inflamación pulmonar, los antígenos se acoplan a microesfera de Sefarosa, que se embolizan a los pulmones de los ratones a través de inyección en sus venas de la cola. Los animales usualmente son presensibilizados al antígeno acoplado. El sistema inmunitario del

anfitrión monta una respuesta inmunitaria vigorosa a microesfera infractora. Estas respuestas inflamatorias focales, que pueden durar varias semanas, pueden ser examinadas histológicamente en cuanto a tamaño. También, se pueden aislar a partir de tejido y se estudian para composición celular y producción de citoquinas. Más aún, los ganglios linfáticos hiliares y bazo están fácilmente disponibles para experimentación.

5 La sarcoidosis, una enfermedad de los humanos, por lo general involucra el pulmón. La determinación de la sarcoidosis y la extensión de la enfermedad se pueden hacer de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las pruebas de función pulmonar pueden evaluar la distensibilidad pulmonar y la función. También, el lavado bronquiolar obtiene células inflamatorias que se han infiltrado en el árbol bronquial durante el proceso inflamatorio. Estas células se pueden estudiar para composición y función. Los infiltrados pulmonares y adenopatías hiliares son característicos de sarcoidosis. Por lo tanto, los rayos x de tórax o escaneos TC periódicos pueden ayudar a evaluar la actividad de la enfermedad. Las pruebas serológicas, como la medición de la actividad de la enzima de conversión de angiotensina de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, se pueden utilizar para medir el grado y actividad de la enfermedad.

15 6. Esclerosis múltiple

Evaluación de la inflamación: la encefalomielitis autoinmunitaria experimental se induce en ratones susceptibles mediante inyección repetida de antígenos de mielina sensibilizante apropiados. Los ratones se evaluaron clínicamente de acuerdo con los siguientes criterios: 0, sin enfermedad; 1, atonía de cola; 2, debilidad de las extremidades posteriores; 3, parálisis de las extremidades posteriores; 4, parálisis de las extremidades posteriores y parálisis o debilidad de las extremidades delanteras; 5, muerte. Para el análisis histológico, se retiran la médula espinal y el cerebro y se fijan en formalina. Las secciones incorporadas en parafina se tiñen y se examinan bajo el microscopio de luz. Se pueden estudiar in vitro los esplenocitos y células dispersas de otras regiones. Estos parámetros pueden ayudar a medir la mejora o alivio de la enfermedad.

En los humanos, la actividad de la enfermedad de MS se mide al monitorizar la progresión y remisión de los signos y síntomas neurológicos. La medición de los resultados más utilizada se llama la Escala Ampliada del Estado de Discapacidad. La composición de proteína de fluido espinal cerebral y el contenido celular analizado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica también se pueden utilizar para controlar la actividad de la enfermedad. Más aún, los estudios de RM de serie muestran nuevas lesiones cerebrales con gadolinio.

35 7. Psoriasis

La psoriasis se puede medir simplemente al estimar el porcentaje de la piel que se ve afectado con dermatitis o más adecuadamente por la puntuación PASI (Actividad de Psoriasis e Índice de Gravedad) que refleja la intensidad de las lesiones de la piel con el tiempo en combinación con el tamaño de la zona de piel afectada.

40 8. Autismo

El autismo es un trastorno del comportamiento y la gravedad de los síntomas sólo se pueden puntuar por los estudios de comportamiento.

45 9. Alergias

La alergia es un complejo de enfermedades asociadas con síntomas inmediatos como hinchazones, estornudos y lagrimeo, y la puntuación de enfermedades es entre otros elaborada a través de la medición de la gravedad de los síntomas específicos relacionados con la exposición al alérgeno relevante.

50 Composiciones de acuerdo con la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición para el almacenamiento de huevos de parásitos de helmintos, tales como el tricocéfalo de cerdo *Trichuris suis*, dicha composición comprende adicionalmente un portador líquido que tiene un valor de pH de por debajo de 7 a una temperatura de desde 0°C a 30°C o desde 5°C hasta temperatura ambiente.

El portador líquido puede ser ácido sulfúrico, H_2SO_4 , tal como H_2SO_4 que tiene un pH por debajo de 6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-5, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-1; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 1-2; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 2-3; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 3-4; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 4-5; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 5-6. Se prefiere un pH de 0 a 2. También se pueden utilizar otros portadores líquidos ácidos y adición de antibióticos.

De acuerdo con una o más realizaciones del primer aspecto de la invención, los parásitos de helmintos se pueden seleccionar de géneros de nematodos tales como *Ascaris*, *Enterobius*, *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Necator*, y *Strongyloides*. El primer aspecto de la invención también cubre una realización, en la que el parásito de helmintos es

un platihelminto. También está dentro de una realización del primer aspecto de la invención que el parásito de helmintos se pueda seleccionar de entre el grupo constituido por trematodos y cestodos.

5 Está dentro de una o más realizaciones del primer aspecto de la invención que el parásito de helmintos se seleccione de los géneros de parásitos Fasciolopsis, Echinostoma, Heterophyes, Clonorchis, Opistorchis, Fasciola, Schistosoma, Diphyllbothrium, Taenia y Hymenolepsis

10 También está dentro una realización del primer aspecto de la invención que el parásito de helmintos se seleccione del grupo que consiste de parásitos filarias y trematodos pulmonares.

Adicionalmente, el primer aspecto de la invención cubre la realización(s), en la que el parásito de helmintos se seleccione del grupo que consiste de los géneros Trichuris, Nippostrongylus, Heligmosomoides, Hymenolepsis, Angiostrongylus, Ascaris, Toxocara, Gnathostoma, Ancylostoma, Anisakis y Pseudoterranova.

15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención el parásito de helmintos es Trichuris suis. Aquí, la composición se puede obtener por un método que comprende las etapas de infectar a un animal, tal como un cerdo, con T. suis, aislar los huevos en las heces de los animales después de un tiempo adecuado, tal como por ejemplo después de aproximadamente 5 a 30 semanas o después de aproximadamente 5 a 11 semanas, tal como después de aproximadamente 7 a 9 semanas después de inoculación, y agregar a los huevos aislados un portador líquido que tiene un valor de pH por debajo de 7 en un rango de temperatura de 0°C a 30°C o desde 5°C hasta temperatura ambiente. Se prefiere que la etapa de aislamiento comprenda un procedimiento de lavado que emplea una serie de etapas de lavado utilizando tamices certificados (tales como, por ejemplo, 1000, 500, 250, 100, 80, 70, 60, 50, y 20 µm de tamaños de malla) de diámetro grande (por ejemplo, Ø 450 mm), en los que las etapas de lavado repetidas emplean tamices que tienen un tamaño de malla reducido, permitiendo de este modo que los huevos a sean lavados y separados de por ejemplo, material vegetal sin digerir en el material de las heces de manera eficiente. Se prefiere que los huevos de parásitos estén contenidos en la fracción tamizada y tengan un tamaño de partícula de 20-50 µm.

30 Cuando los huevos de helmintos son de la especie Trichuris suis (TSO), el primer aspecto de la invención también cubre una realización, en la que la composición se obtiene por un método que comprende la etapa de recuperar los huevos del parásito de gusanos aislados directamente desde el intestino o de contenido intestinal de cerdos, y la adición de dichos huevos a un portador líquido que tiene un valor de pH por debajo de 7 en un rango de temperatura de 0°C a 30°C. Aquí, los gusanos aislados se pueden lavar una vez o más de una vez en un medio que comprende opcionalmente uno o más antibióticos antes de la recuperación de los huevos. Se prefiere que los gusanos aislados se conserven in vitro en medio de crecimiento, opcionalmente suplementado con antibióticos, en el que los gusanos aislados ponen sus huevos. Los huevos se pueden separar del medio de crecimiento mediante filtración sobre un tamiz (por ejemplo, 50 µm) antes de ser agregados a dicho portador líquido.

Métodos de acuerdo con la invención

40 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el aislamiento y almacenamiento de huevos de tricocéfalos de cerdo Trichuris suis. El método del segundo aspecto de la invención comprende las etapas de

45 a) aislamiento de los huevos del parásito, ya sea 1) in vitro, en el que los gusanos retirados por el intestino de los cerdos ponen sus huevos en un medio adecuado, o 2) a partir de material fecal de los cerdos, en el que los huevos se desprenden de los gusanos encontrados en el intestino, y

50 b) almacenamiento de los huevos aislados y opcionalmente limpiados en un medio ácido, tal como por ejemplo H₂SO₄, tal como H₂SO₄ que tiene un pH de 0-2 o 0-1 o 1-2, para permitir el desarrollo de los huevos (embrionación) y para inactivar cualquier bacteria y virus contaminantes.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el aislamiento y almacenamiento de huevos de tricocéfalos de cerdo Trichuris suis, dicho método comprende las etapas de

55 a) aislar los huevos del parásito ya sea 1) in vitro, en el que los gusanos retirados por el intestino de los cerdos ponen sus huevos en un medio adecuado, o 2) a partir de materia fecal de los cerdos, en la que los huevos son derramados por los gusanos que se encuentran en el intestino,

60 b) filtrar el material aislado para reducir la contaminación de partículas y los huevos de parásitos del cerdo extraños,

c) hacer flotar el material aislado para reducir la contaminación de partículas,

65 d) lavar el material aislado en un medio ácido, tal como por ejemplo ácido sulfúrico, H₂SO₄, tal como H₂SO₄ que tiene un pH de 0-2 o 0-1 o 1-2, para reducir el recuento de patógenos extraños (bacterias, hongos y virus), tanto por dilución como por inactivación,

e) almacenamiento de los huevos aislados y limpiados en un medio ácido, tal como por ejemplo H_2SO_4 , tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-2 o 0-1 o 1-2, para permitir el desarrollo de los huevos (embrionación) y para inactivar y evitar adicionalmente el crecimiento de bacterias, hongos y virus,

5 f) filtrar y hacer flotar los huevos embrionados para aislar la fracción de huevos que tiene un grado de embrionación (potencial biótico de la material prima farmacéutica), y

10 g) almacenar los huevos aislados y embrionados en un medio ácido, tal como por ejemplo H_2SO_4 , tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-2 o 0-1 o 1-2, que pueden permitir el mantenimiento del potencial biótico y la prevención de crecimiento de patógenos.

15 Para los métodos de tanto el segundo y tercer aspectos de la invención se prefiere que el medio ácido utilizado para se prefiere que el medio ácido utilizado para almacenamiento de los huevos sea un portador líquido que tenga un valor de pH por debajo de 7. El portador líquido puede ser ácido sulfúrico, H_2SO_4 , tal como H_2SO_4 que tiene un pH por debajo de 6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-5, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-1; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 1-2; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 2-3; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 3-4; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 4-5; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 5-6. Se prefiere un pH de desde 0 hasta 2. También se pueden utilizar otros portadores líquidos y adición de antibióticos.

20 Para los métodos tanto el segundo como tercer aspecto de la invención, estos métodos también cubren realizaciones que comprenden adicionalmente una etapa, en la que los huevos almacenados en el medio ácido se desarrollan a partir de huevos no embrionados (que contienen células no diferenciadas) en huevos totalmente embrionados (que contienen etapas de larvas infectantes), para obtener de ese modo una suspensión de huevos embrionados en el medio ácido. Cuando el medio ácido que comprende el huevo embrionado es H_2SO_4 que tiene un pH en el rango de 0-2, entonces esto va a permitir la administración oral de la suspensión.

25 Para el método del tercer aspecto de la invención, a continuación, de acuerdo con una realización la etapa b) es opcional. También está dentro de una realización del tercer aspecto de la invención que la etapa c) sea opcional. El tercer aspecto de la invención cubre también realizaciones en las que la etapa d) es opcional y/o en el que la etapa f) es opcional.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una composición farmacéutica que comprende una preparación de parásitos de helmintos, que comprende las etapas de:

35 (1) elevar un animal de preparación en un entorno específico libre de patógenos humanos;

(2) obtener un primer aislado de parásitos de helmintos a partir de dicho animal de preparación;

40 (3) extraer los huevos de dicho primer aislado de parásitos de helmintos, in vitro o a partir de cultivos fecales;

(4) almacenar huevos no embrionados desde dicho primer aislado de parásitos de helmintos en una composición que comprende adicionalmente un portador líquido ácido; y

45 (5) embrionar los huevos a partir de dichos aislados de parásitos de helmintos bajo condiciones adecuadas en dicho portador líquido ácido para generar una composición farmacéutica.

Está dentro de una realización del cuarto aspecto de la invención que el método comprenda adicionalmente la etapa de:

50 (6) almacenar los huevos embrionados de dicho aislado de parásito de helmintos bajo condiciones adecuadas en el portador líquido ácido.

55 También para el cuarto aspecto de la invención se prefiere que el portador líquido ácido tenga un valor de pH por debajo de 7. El portador líquido puede ser ácido sulfúrico, H_2SO_4 , tal como H_2SO_4 que tiene un pH por debajo de 6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-6, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-5, tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 0-1; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 1-2; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 2-3; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 3-4; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 4-5; tal como H_2SO_4 que tiene un pH de 5-6. Se prefiere un pH de desde 0 hasta 2. También se pueden utilizar otros portadores líquidos y adición de antibióticos.

60 Está dentro de una realización del cuarto aspecto de la invención que la etapa de aislar un parásito de helmintos comprende obtener heces de dicho animal de preparación, y aislar el parásito de helmintos a partir de dichas heces. Aquí, la etapa de aislar un parásito de helmintos puede comprender la eliminación de tejido de dicho animal de preparación, y aislar el parásito de helmintos o sus huevos de dicho tejido. Preferiblemente, el tejido puede ser un órgano interno tal como los intestinos. También se prefiere que la etapa de aislar dicho parásitos de helmintos comprenda adicionalmente las etapas de:

65

(1) disectar los tejidos de dicho animal de preparación para permitir el aislamiento macroscópico de gusanos para producir un cultivo de gusanos en el que estos ponen huevos,

(2) filtrar el cultivo de gusanos para producir un filtrado con huevos; y

(3) aislar los huevos de dicho filtrado, extrayendo de este modo los huevos de dicho aislado de parásitos de helmintos.

De acuerdo con una realización del cuarto aspecto de la invención, la preparación de parásitos de helmintos puede comprender un parásito, que es un nematodo.

El cuarto aspecto de la invención también cubre una o más realizaciones, en las que la preparación de parásitos de helmintos comprende un parásito seleccionado del grupo que consiste en los géneros Ascaris, Enterobius, Trichuris, Ancylostoma, Necator, Strongyloides.

También está dentro de una realización del cuarto aspecto de la invención que la preparación de parásitos de helmintos comprenda un parásito que es un platihelminto. También está dentro de una realización del cuarto aspecto de la invención que la preparación de parásitos de helmintos comprenda un parásito seleccionado del grupo que consiste de trematodos y cestodos.

Está dentro de una o más realizaciones del cuarto aspecto de la invención que la preparación de parásitos de helmintos comprenda un parásito seleccionado del grupo que consiste de los géneros Fasciolopsis, Echinostoma, Heterophyes, Clonorchis, Opistorchis, Fasciola, Schistosoma, Diphyllbothrium, Taenia y Hymenolepis.

También está dentro una realización del cuarto aspecto de la invención que la preparación de parásitos de helmintos comprenda un parásito seleccionado del grupo que consiste en parásitos filarias y trematodos pulmonares.

Adicionalmente, el cuarto aspecto de la invención cubre la realización(s), en la que la preparación de parásitos de helmintos comprende un parásito seleccionado del grupo que consiste de los géneros Trichuris, Nippostrongylus, Heligmosomoides, Hymenolepis, Angiostrongylus, Ascaris, Toxocara, Gnathostoma, Ancylostoma, Anisakis y Pseudoterranova.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el parásito de helmintos es Trichuris suis.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para el tratamiento profiláctico, de mejora o curativo de una enfermedad autoinmunitaria o enfermedad alérgica en un individuo, hombre o animal, dicho método comprende las etapas de proporcionar una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, aislar gusanos de helmintos de los intestinos, incubar los gusanos aislados, bajo condiciones de crecimiento adecuadas en las que ponen huevos, separar los huevos de los medios o aislar los huevos del contenido intestinal, transferir los huevos a un portador líquido ácido obteniendo de este modo una suspensión de huevos de helmintos, mezclar los huevos con un portador farmacéuticamente aceptable para generar una composición farmacéutica y administrar dicha composición farmacéutica en una cantidad farmacéuticamente efectiva a un individuo, hombre o animal, que sufre de una enfermedad autoinmunitaria o alérgica, o prevenir la ocurrencia de dichas enfermedades.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria o alérgica en un individuo, hombre o animal, dicho método comprende las etapas de proporcionar una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, embrionar los huevos del parásito de helmintos bajo condiciones adecuadas en el portador líquido ácido, obteniendo de este modo una composición farmacéutica y administrar dicha composición farmacéutica en una cantidad farmacéuticamente efectiva a un individuo, hombre o animal que sufre de una enfermedad autoinmunitaria o enfermedad alérgica o prevenir la aparición de dicha enfermedad.

De acuerdo con una realización del quinto o sexto aspecto de la invención la enfermedad autoinmunitaria puede ser enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser enfermedad de Crohn (CD) o colitis ulcerativa (UC).

También está dentro de una realización del quinto o sexto aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser artritis reumatoide.

De acuerdo con una realización del quinto o sexto aspecto de la invención la enfermedad autoinmunitaria puede ser lupus eritematoso.

También está dentro de una realización del quinto o sexto aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser diabetes mellitus tipo 1.

También está dentro de una realización del quinto o sexto aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser sarcoidosis. El quinto o sexto aspecto de la invención también cubre una realización en la que la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.

- 5 También está dentro de una realización del quinto o sexto aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser psoriasis, o la enfermedad autoinmunitaria puede ser autismo.

De acuerdo con una realización del quinto o sexto aspecto de la invención la enfermedad puede ser alergia.

- 10 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar una respuesta inmunitaria excesiva en un individuo, hombre o animal, dicho método comprende las etapas de proporcionar una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, embriónar huevos a partir del parásito de helmintos bajo condiciones adecuadas en el portador líquido ácido, obteniendo de esta manera una composición farmacéutica y administrar dicha composición farmacéutica en una cantidad suficiente para reducir la respuesta inmunitaria excesiva en el individuo, hombre o animal. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria excesiva puede ser una respuesta inmunitaria Th1 mejorada.

- 20 De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención se proporciona un método para prolongar la supervivencia de aloinjerto de órgano en un individuo, hombre o animal, dicho método comprende regular en descenso la actividad inmunitaria Th1 en el individuo, hombre o animal al administrar al individuo una cantidad con regulación al alza de Th2 efectiva de una composición farmacéutica que comprende una actividad con regulación al alza de Th2, dicho método comprende las etapas de proporcionar una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, embriónar huevos a partir del parásito de helmintos bajo condiciones adecuadas en el portador líquido ácido, obteniendo de esta manera una composición farmacéutica que comprende una actividad con regulación al alza de Th2 y administrar dicha composición farmacéutica en una cantidad suficiente para prolongar la supervivencia del aloinjerto de órgano en el individuo, hombre o animal al regular en descenso la actividad Th1 en el individuo.

- 30 También está dentro de una realización del octavo aspecto de la invención, dicho tratamiento puede ser la mejora profiláctica o curativa.

Está dentro de una realización del quinto, sexto, séptimo o octavo aspecto de la invención que el individuo es un mamífero, tal como un humano o un animal doméstico.

- 35 De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica para tratar una enfermedad autoinmunitaria o alérgica en un individuo, hombre o animal en necesidad de dicho tratamiento. Por lo tanto, la enfermedad autoinmunitaria puede ser enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser enfermedad de Crohn (CD) o colitis ulcerativa (UC).

De acuerdo con una realización del noveno aspecto de la invención, la enfermedad autoinmunitaria puede ser artritis reumatoide.

- 45 El noveno aspecto de la invención también cubre una realización, en la que la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso.

- 50 También está dentro de una realización del noveno aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser diabetes mellitus tipo 1. Adicionalmente, el noveno aspecto de la invención cubre una realización, en la que la enfermedad autoinmunitaria es sarcoidosis, y una realización, en la que la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple.

También está dentro de una realización del noveno aspecto de la invención que la enfermedad autoinmunitaria puede ser psoriasis o que la enfermedad autoinmunitaria puede ser autismo.

- 55 De acuerdo con una realización del noveno aspecto de la invención la enfermedad autoinmunitaria puede ser alergia.

También está dentro de una realización del noveno aspecto de la invención que la fabricación del medicamento comprende un método seleccionado de cualquiera de las realizaciones del cuarto aspecto de la invención.

- 60 De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una composición de acuerdo con una realización seleccionada de cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento o una composición farmacéutica para tratar una respuesta inmunitaria excesiva en un individuo, hombre o animal en necesidad de dicho tratamiento. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria excesiva puede ser una respuesta de Th1 mejorada.

- 65

Está dentro de una realización del noveno o décimo aspecto de la invención que dicho tratamiento es la mejora profiláctica o curativa. También está dentro de una realización del noveno o décimo aspecto de la invención que el individuo es un mamífero, tal como un humano o un animal doméstico.

- 5 Otras características y ventajas de la invención resultarán más evidentes con referencia a los siguientes dibujos y descripción de realizaciones preferidas.

Breve descripción de las ilustraciones

- 10 La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un método para el aislamiento de huevos de parásitos en las heces (depositadas por los gusanos intestinales in situ) o de gusanos en cultivo (depositado por los gusanos aislados in vitro) a partir de cerdos infectados con el tricocéfalo, *Trichuris suis* de acuerdo con una realización de la presente invención,

- 15 La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un método para reducción de la contaminación de partículas y el retiro de huevos de parásitos extraños en una suspensión de huevos de tricocéfalos de cerdo *Trichuris suis* de acuerdo con una realización de la presente invención,

- 20 La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra un método para embrionación, almacenamiento y conservación de los huevos de tricocéfalos del cerdo *Trichuris suis* para ser utilizados como materia prima para un agente farmacéutico para administración oral de acuerdo con una realización de la presente invención, y

La Figura 4 ilustra el ciclo de vida de los tricocéfalos de cerdo *Trichuris suis*.

- 25 Descripción detallada de la invención

En las siguientes (etapas 1 a 9) se da una descripción detallada de realizaciones que se relacionan con la presente invención. Las realizaciones cubren la recuperación de los huevos del parásito (1, 2), reducción de la contaminación de partículas (3, 4), retiro de los huevos de parásitos extraños (5), lavado en un medio ácido (6), embrionación de los huevos del parásito (7), almacenamiento de huevos de parásitos (8), y administración de una suspensión de huevos del parásito (9).

- 30 1. Recuperación de huevos de parásitos en las heces (gusanos in situ)
- 35 Los cerdos infectados con el gusano intestinal *T. suis* común excretaron los huevos del parásito en las heces de los cerdos aproximadamente 7 a 9 semanas después de que se inocularon. Estos huevos se pueden recolectar en grandes cantidades a partir de las heces. El proceso de aislamiento se basa en el procedimiento de lavado en serie de tamices de acero certificados (por ejemplo 1000, 500, 250, 100, 80, 70, 60, 50, y 20 μm de tamaños de malla) de diámetro grande (por ejemplo, 0 450 mm). El procedimiento de lavado se repite en tamices con reducción de tamaño
- 40 de malla, permite que los huevos se puedan lavar eficazmente fuera de las fibras de plantas no digeridas en el material de heces. Los huevos de parásitos están contenidos en la fracción tamizada con tamaño de partícula 20-50 μm . La fracción de 20-50 μm se resuspende en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2), los antibióticos eventualmente agregados, minimizan el crecimiento de patógenos y se procesan adicionalmente en las etapas 3 y/o 4 a continuación.

- 45 2. Recuperación de huevos de parásitos de gusanos (gusanos in vitro)
- Los huevos se pueden recuperar alternativamente en cantidades más bajas de los gusanos que se aíslan directamente desde el intestino de los cerdos. Después de repetidos lavados en medios con antibióticos, los gusanos se mantienen in vitro en medio de crecimiento con antibióticos u otros conservantes en los que ponen sus huevos. Los huevos se separan de los medios mediante filtración sobre un tamiz de 50 μm seguido de filtración sobre un tamiz de 20 μm . La fracción resultante de 20-50 μm se procesa adicionalmente en las etapas 3 y/o 4 a continuación.

- 55 3. Reducción de la contaminación de partículas mediante flotación
- Las suspensiones de huevos provienen de la etapa 1 y/o la etapa 2 constituyen el material inicial para una reducción adicional del contenido de partículas no deseadas. En estas suspensiones, todas las partículas tienen entre 20 y 50 μm , pero los huevos tienen menor densidad que la mayoría de las otras partículas (fibras vegetales y partículas minerales). Por lo tanto, los huevos pueden flotar en los fluidos de flotación con gravedad específica de más de 1.18 g por ml, tal como una suspensión de sal y azúcar saturada, tales como cloruro de sodio-glucosa, o los huevos pueden flotar en soluciones de sulfato de magnesio o cloruro de zinc. Mediante centrifugación, los huevos flotarán y se sedimentarán los desechos. Los huevos que flotan se aíslan y lavan sobre un tamiz de 20 μm y se resuspenden en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2).

- 65 4. Reducción de contaminación de partículas mediante filtración

Las suspensiones de huevos resultante de las etapas 1, 2 y/o 3, que contienen partículas en el rango de tamaño de 20-50 μm , se limpian adicionalmente mediante filtración en red de nylon desechable con un tamaño de malla certificado de 30-35 μm , se recuperan huevos en red de nylon de 20-25 μm .

5

5. Retiro de huevos de parásitos extraños mediante filtración

La filtración de la suspensión a 30-35 μm asegura que se conservan los huevos de parásitos extraños, que pueden haber estado en la solución fecal original. Aunque los huevos de *Trichuris suis* tienen hasta 80 μm de longitud, sólo tienen alrededor de 23 a 30 μm de ancho, son delgados y tienen forma de limón y se orientan en la dirección longitudinal de la corriente de la solución que pasa en un tamiz. Por lo tanto, los experimentos han mostrado que los huevos de *T. suis* pasarán un tamiz de 30 μm . Otros huevos con el potencial de no infectar cerdos serán: *Ascaris suum* (50-84 μm), *Metastrongylus* (38-64 μm) *Strongyloides* 30-57 μm , *Globocephalus* (40-72 μm), *Oesophagostomum* (38-83 μm), *Hyostrongylus* (31-76 μm), *Macracanthorhynchus* (65-110 μm). También serán retenidos los huevos de gusano redondo común de gatos y perros *Toxocara* (75-90 μm).

10

15

6. Lavado e inactivación de patógenos mediante H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2)

Después de filtración, la suspensión se lava repetidamente en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2), para reducir cualesquier esporas de patógenos o patógenos por dilución. Adicionalmente el crecimiento de patógenos es impedido por H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2).

20

7. Embrionación de huevos de *Trichuris suis* (TSO) en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2)

La suspensión se almacena en una incubadora a temperaturas de 15-30°C para el desarrollo de huevos desde no embrionados a embrionados. El proceso de embrionación tomará de 2 a 6 meses dependiendo de la temperatura de incubación.

25

8. Almacenamiento de huevos de *Trichuris suis* (TSO) en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2)

Después de embrionación, la materia prima farmacéutica, se puede almacenar a temperaturas en el rango de 1-10°C con la infectividad sin cambios en períodos de hasta a varios años. Por lo tanto, las larvas dentro del huevo se mantendrán infecciosas en este periodo. El ácido evitará el crecimiento de patógenos.

30

9. Administración oral de suspensión de huevos (TSO) en H_2SO_4 (por ejemplo pH 0-2)

La suspensión que contiene los huevos de helmintos embrionados (con larvas infecciosas) se pueden administrar directamente a un individuo (hombre o animal) como una suspensión oral ya sea en cápsulas o por otros medios.

35

Los métodos y/o realizaciones relacionadas con la presente invención se describen adicionalmente en los diagramas de flujo mostrados en las Figuras 1 a 3.

40

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra métodos para el aislamiento de huevos de parásitos en las heces (gusanos in situ) o gusanos intestinales (gusanos in vitro) los cerdos infectados con los tricocéfalos *Trichuris suis* de acuerdo con una realización de la presente invención.

45

En la Figura 1 el punto de partida es la inoculación de cerdos con el material 101 de parásitos. A continuación, con el fin de recuperar los huevos del parásito, se pueden seguir dos rutas. La primera ruta en la Figura 1 corresponde a la etapa 2 descrita anteriormente y comprende las etapas: Tomar el intestino 102a; recolectar los gusanos 103a; lavar los gusanos 104a; recuperación in vitro de huevos en los medios utilizados para cultivo de gusanos 105a; filtrado y resuspensión de huevos en ácido sulfúrico (H_2SO_4) para minimizar el crecimiento bacteriano 106a; y terminar con la materia prima para reducción de la contaminación de partículas 107. La segunda ruta en la Figura 1 corresponde a la etapa 1 discutida anteriormente y comprende las etapas: recolectar materia fecal 102b; suspender y tamizar la materia fecal 103b; recuperación de una fracción tamizada 104b; aislamiento in vitro de huevos de materia fecal 105b; filtrado y resuspensión de huevos en ácido sulfúrico (H_2SO_4) para minimizar el crecimiento bacteriano 106b; y terminar con la materia prima para la reducción de la contaminación por partículas 107.

50

55

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un método para la reducción de la contaminación de partículas y la eliminación de huevos de parásitos extraños en una suspensión de huevos de los tricocéfalos de cerdo *Trichuris suis* de acuerdo con una realización de la presente invención. La ruta descrita en el diagrama de flujo de la Figura 2 corresponde a las etapas 3 a 6 discutidas anteriormente. El punto de partida es la materia prima de los huevos recuperados de gusanos o heces luego de la etapa 107 de la Figura 1. A continuación, el método ilustrado en la Figura 2 sigue las etapas: tamizado y resuspensión de los huevos en un fluido de flotación de sal-azúcar 201; centrifugación y aislamiento de huevos que flotan 202; desechar el sedimento con partículas extrañas con una densidad mayor que el fluido de flotación de sal-azúcar 203; resuspensión de los huevos que flotan en ácido sulfúrico H_2SO_4 204; filtración de la suspensión de huevos a través de una red de nylon con tamaño de malla de 30-

60

65

50 micrómetros 205, seguida por el retiro de partículas y huevos de parásitos extraños mayores de 30 micrómetros; filtración de la suspensión de huevos en red de nylon con tamaño de malla de 20 micrómetros eliminando de esta manera las partículas menores de 20 micrómetros 206; lavado repetido en ácido sulfúrico 207 para reducir de esta manera los patógenos mediante dilución; ajustar la concentración de huevos en la solución 208; y almacenar los huevos en ácido sulfúrico 209 para obtener de este modo la materia prima para embrionación de los huevos.

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra un método para embrionación, almacenamiento y preparación de los huevos de tricocéfalos del cerdo *Trichuris suis* que se van a utilizar como materia prima para un agente farmacéutico para administración oral de acuerdo con una realización de la presente invención. La ruta descrita en el diagrama de flujo de la Figura 3 corresponde a las etapas 7 a 9 discutidas anteriormente. El punto de partida es la materia prima de los huevos limpiados mediante flotación y tamizado etapa 209 de la Figura 2. A continuación, el método ilustrado en la Figura 3 sigue las etapas: embrionación de los huevos en ácido sulfúrico a 15-30°C durante 2 a 6 meses con agitación repetida o agitación 301 y observaciones continuas del desarrollo de los huevos no diferenciados en huevos que contienen larvas (embrionación) 302; se deja que la embrionación progrese hasta que el coeficiente de embrionación está en el rango de 60-90% o más del 90% 303; lavado de los huevos a 2-10°C en ácido sulfúrico H₂SO₄ 304; ajuste de la concentración de huevos en la solución para almacenamiento 305 a granel; almacenamiento de los huevos a 1-10°C en ácido sulfúrico (H₂SO₄), eventualmente se agregan antibióticos, para prevenir de este modo el crecimiento de patógenos 306; ajuste de la concentración de huevos en la solución para los requisitos de la materia prima farmacéutica 307, que puede ser seguida por la preparación de una suspensión estandarizada; una dosis de la solución de huevo se puede poner en contenedores 308 de envío, que pueden ser seguidos por el empaque y etiquetado, control, entrega y distribución.

La Figura 4 ilustra el ciclo de vida de los tricocéfalos de cerdo *Trichuris suis*. Los gusanos adultos se encuentran en y sobre la pared 401 del intestino grueso del cerdo 402. Los huevos de gusano se pueden obtener de dos maneras: 1) los gusanos se transfieren a una placa de cultivo en la que se incuban en un medio 403 en el que ponen sus huevos, o 2) los huevos se recuperan directamente de las heces al tamizar el material fecal. Los huevos resultantes de cualquiera de 1) o 2) son no embrionados 404 que contiene material indiferenciado. Después del almacenamiento en un medio ácido durante 2 a 6 meses, eventualmente se agregan antibióticos, los huevos se vuelven embrionados 405 con una estructura larval claramente visible en el interior. Son estos huevos embrionados los que constituyen el agente farmacéutico activo para administración oral, huevos de *Trichuris suis* (TSO).

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislamiento y almacenamiento de huevos embrionados del tricocéfalo de cerdo *Trichuris suis*, dicho método comprende las etapas de:
- 5 a) infectar un animal con *Trichuris suis*;
- b) aislar huevos de *Trichuris suis* de las heces del animal después de 7-9 semanas, en el que el aislamiento de los huevos comprende un procedimiento de lavado repetido sobre tamices de acero certificados con tamaño de malla reducido, que incluye filtración sobre un tamiz de acero certificado de tamaño de malla 50 μm seguido por filtración sobre un tamiz planeado certificado de tamaño de malla de 20 μm , en el cual los huevos de *Trichuris suis* se aíslan en una fracción tamizada con tamaño de partícula de 20-50 μm ;
- 10 c) resuspender la fracción tamizada de 20- 50 μm con huevos aislados en ácido sulfúrico, H_2SO_4 , que tiene un valor de pH de 0-2;
- d) limpiar la suspensión de huevos aislada que contiene partículas en el rango de tamaño de 20-50 μm mediante filtración en una red de nylon desechable con tamaño de malla certificado de 30-35 μm y recuperar los huevos sobre una red de nylon de 20-25 μm ;
- 20 e) lavar de forma repetida la suspensión de huevos limpia en ácido sulfúrico, H_2SO_4 que tiene un pH de 0-2, para reducir cualquier patógeno o esporas de patógeno mediante dilución;
- f) embrionar los huevos de *Trichuris suis* al almacenar la suspensión o composición de huevos lavados y ácido sulfúrico, H_2SO_4 con un pH de 0-2 en un incubador a temperaturas de 15-30°C en 2 6 meses para desarrollo de los huevos desde huevos no embrionados hasta huevos embrionados; y
- 25 g) almacenar los huevos aislados y embrionados a temperaturas en el rango de 1-10°C en ácido sulfúrico, H_2SO_4 , que tiene un pH de 0-2, permitiendo de esta manera el mantenimiento de potencial biótico y la prevención de crecimiento de patógenos.
- 30
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa c) se sigue por la etapa de:
- hacer flotar la suspensión de huevos aislada en un fluido de flotación con una gravedad específica de más de 1.18 g por ml, o en una solución de sulfato de magnesio o cloruro de zinc.
- 35
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el fluido de flotación con una gravedad específica de más de 1.18 g por ml es una suspensión de sal- azúcar saturada, tal como cloruro de sodio-glucosa.
- 40
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que los tamices certificado utilizados para las etapas de lavado repetidas en el procedimiento de lavado para el aislamiento de los huevos tiene tamaños de malla reducidos de 1000, 500, 250, 100, 80, 70, 60, 50, y 20 μm .
- 45
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los tamices certificados utilizados para las etapas de lavado repetidas en el procedimiento de lavado para el aislamiento de los huevos tienen un diámetro grande de 450 mm.

Fig. 1: Un método para el aislamiento de huevos de parásitos a partir de heces (gusanos in situ) o gusanos intestinales (gusanos in vitro) de cerdos infectados con tricocéfalo *Trichuris suis*

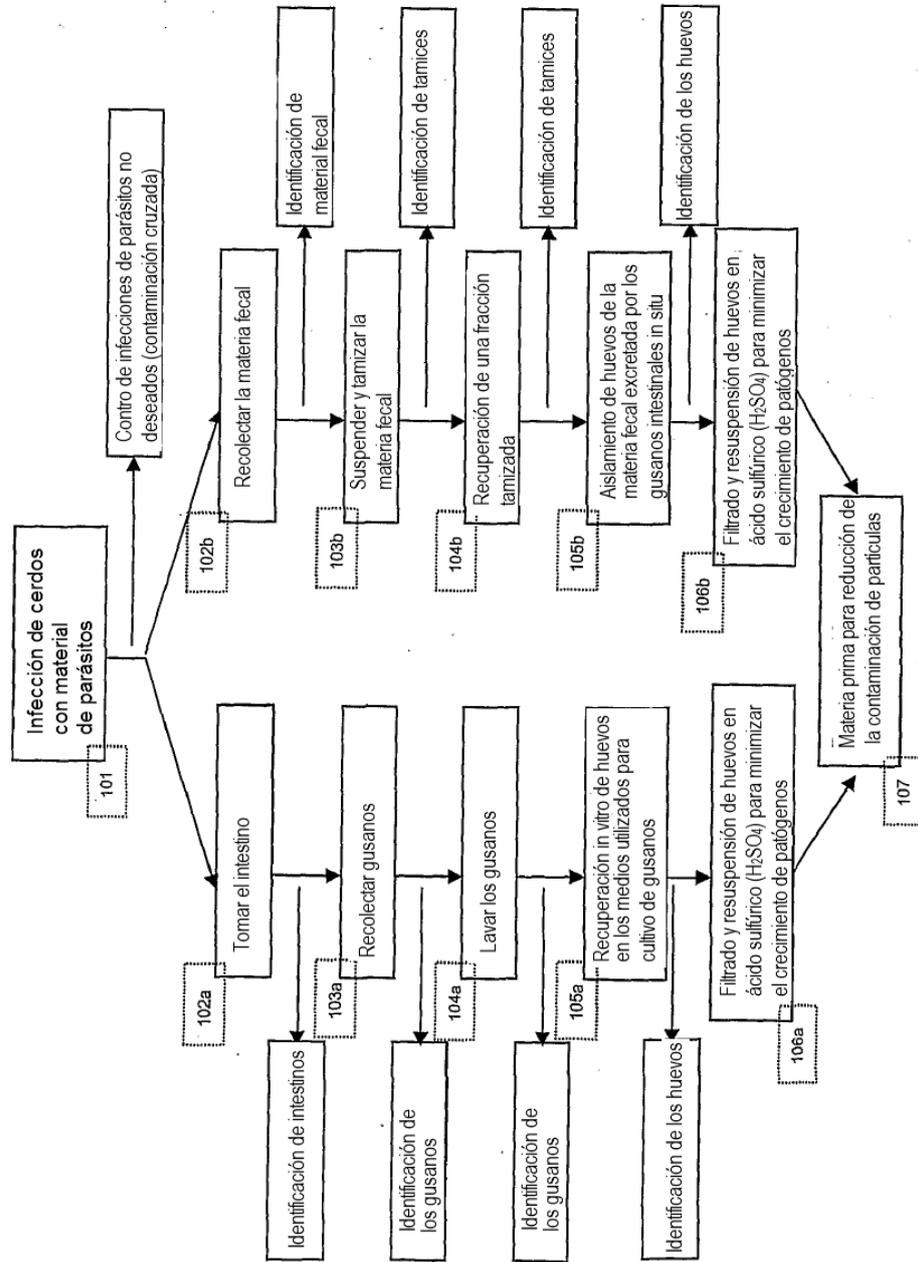


Figura 2: Un método para reducción de contaminación por partículas y retiro de huevos de parásitos extraños en una suspensión de huevos de tricocéfalo de cerdo *Trichuris suis*

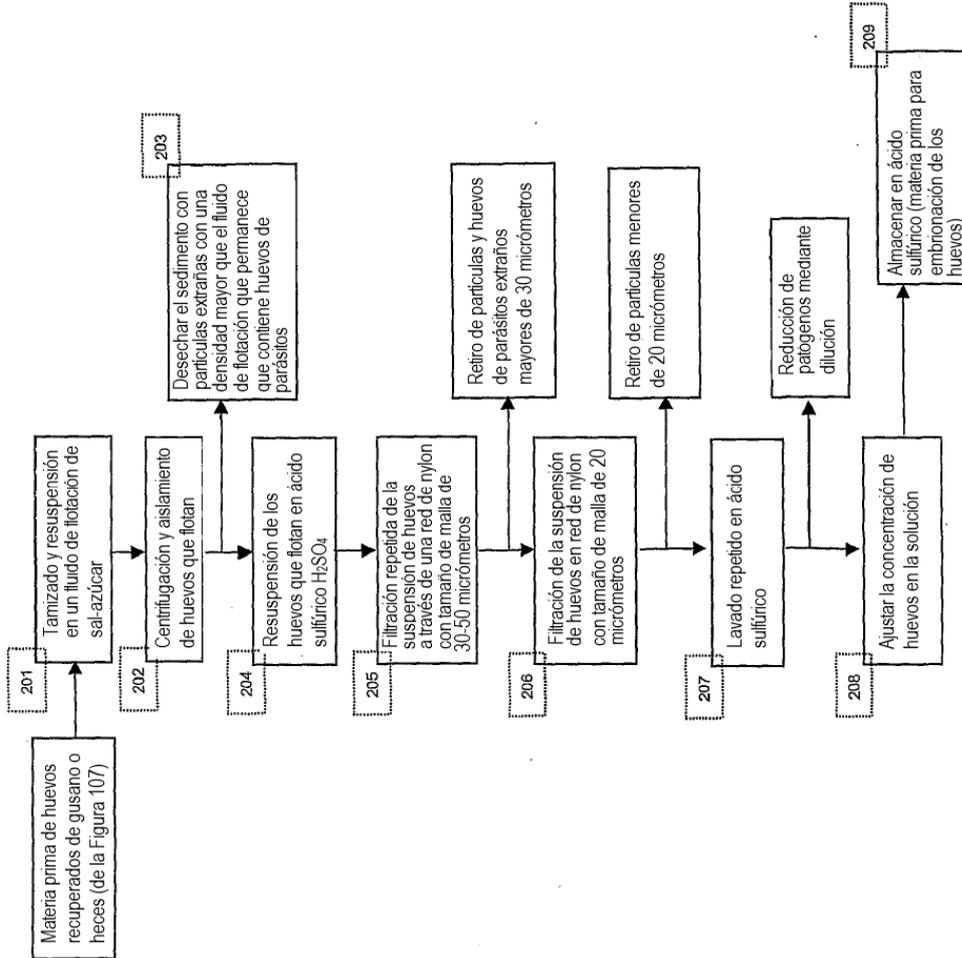


Figura 3: Un método de embrionación, almacenamiento y preparación de huevos del tricocéfalo de cerdo *Trichuris suis* utilizados como materia prima para un agente farmacéutico para administración oral

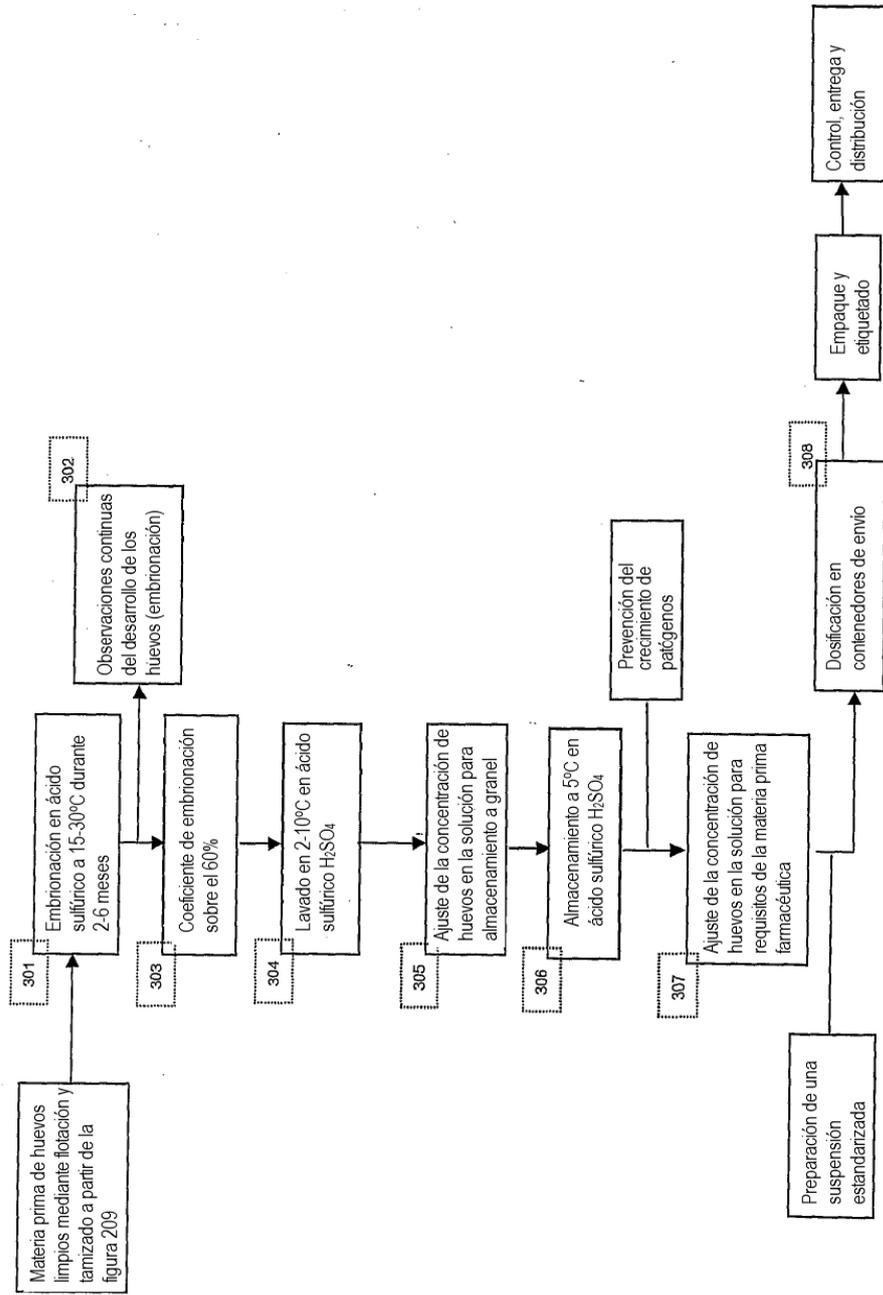


Figura 4: El ciclo de vida del tricocéfalo de cerdo *Trichuris suis*

