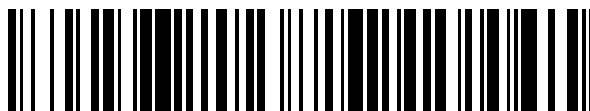


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 053**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2003 PCT/LV2003/00006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2003 WO03105875**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2003 E 03733607 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 1537872**

54 Título: **Inmunoestimulante que tiene una acción antineoplásica y procedimiento para producir dicho inmunoestimulante**

30 Prioridad:

**14.06.2002 LV 020108**

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

**08.08.2018**

73 Titular/es:

**DITESAN LTD. (100.0%)  
Teatra iela 9-9  
Riga 1050 , LV**

72 Inventor/es:

**MUCENIECE, AINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 678 053 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

Inmunoestimulante que tiene una acción antineoplásica y procedimiento para producir dicho inmunoestimulante

5 La presente invención, se refiere al sector de la medicina, a procedimientos para producir preparaciones para la inmunoterapia activa de tumores malignos, tales como, por ejemplo, el melanoma maligno.

10 En la actualidad, se conoce el inmunoestimulante consistente en una mezcla de antígenos tumorales y la fuente de Mn<sup>++</sup> (iones de manganeso) Patente británica UK nº 1 592 496, registrada en fecha 24 / 11 de 1997 y la patente francesa nº 2 423 223, registrada en fecha 20.5.1979 (Clas. Int. A61K39/00). Dicho inmunoestimulante, probó su eficacia, en las etapas primarias de enfermedades, o en el caso de un tratamiento secundario mediante una pequeña cantidad de células remanentes, después del primer tratamiento.

15 Sin embargo, si la administración debe llevarse a cabo al interior de un tumor de un tamaño considerable, la inyección, podría parecer inútil o incluso convertir las cosas en peores, debido al incremento de número de antígenos tumorales circulantes que, a su vez, bloqueen las células inmunes.

20 Las posibilidades de preparar las vacunas específicas a partir de tumores individuales, se encuentran limitadas por el tiempo y por la cantidad material disponible.

25 Así mismo, se conocen adyuvantes inmunoestimulantes los cuales contienen el antígeno primario procedente de la célula muerta de B.Pertussis NRRL-11.232, acoplada con diisocianato, con el segundo antígeno procedente de las células vivas de adenocarcinoma (patente estadounidense US nº 4 285 930, registrada en fecha 13.11.1979 (Clas. Int. A61K39/12)).

30 La aplicación de los mencionados estimulantes, incrementaba la eficiencia de la compleja terapia. Al mismo tiempo, la aplicación de tales tipos de preparaciones, viene acompañada de efectos secundarios, tanto de índole local como de índole general, tales como, por ejemplo, los consistentes en la inflamación, úlceras, linfadenopatía, fenómenos de hipersensibilidad, etc.

35 A partir de los estimulantes conocidos, el más similar al inmunoestimulante propuesto de inmunidad celular con efecto antitumoral, es aquél que contiene el cultivo viral atenuado del Vaccinia virus, cepa AS ATTC No. VR 2010 (patente estadounidense US No. 4 315 914, registrada en fecha 04.04.1980 / Clas. Int. A61K45/05/).

40 El inmunoestimulante, se produce mediante el aislamiento del Vaccinia virus, no patogénico, haciéndolo pasar en un cultivo monocapa de células de riñón de la rata, y propagándolo en un cultivo monocapa de embriones de pollos.

45 Este inmunoestimulante, viene representado por el mayor estructuralmente y antigénicamente complejo virus de DNA genómico, expresándose en sí mismo, como el estimulante policlonal del sistema inmune, que afecta, sobre todo, a la inmunidad celular. En el caso de la administración parenteral perdurable de éste, podrían aparecer varios efectos secundarios, tales como, por ejemplo, los consistentes en las reacciones de hipersensibilidad, los cuales son típicos, así mismo, también, para los inmunoestimulantes bacterianos no específicos.

50 Estos efectos secundarios, reducen la efectividad de la aplicación de la preparación mediante la cual se pretende suprimir el desarrollo del tumor que aparece después de la operación.

En muchos casos, estos efectos secundarios, convierten la aplicación de esta preparación en imposible, en general.

55 Los virus Coxsackie del grupo A, han mostrado ser activos contra las células malignas *in vitro* e *in vivo* y el Echovirus tipo 7, *in vitro* (publicación de patente internacional WO 01/37866, registrada en fecha 31.5.2001 /Clas. Int. A61K39/12/), pero no se aborda la preparación del Echovirus. Incluso si los virus pertenecen a la misma familia, o resulta de una forma automática, a partir de ello, el hecho de que, éstos, sean igualmente oncotrópicos y oncolíticos.

60 Ferdats et al, en Melanoma Research: 329 – 330 (1999), indican que se ha desarrollado y se ha probado una vacuna de echovirus, pero no proporcionan detalles técnicos sobre el desarrollo y la fabricación de tal tipo de producto de vacuna, mediante la utilización del tipo E7.

65 Sinkovics et al., abordan, en Journal of Clinical Virology 16: 1-15 (2000), principalmente, las propiedades oncolíticas del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Newcastle disease virus] -) y mencionan brevemente una cepa de echovirus utilizada como vacuna, para prevenir o evitar las recaídas o reincidencias del melanoma, pero no se proporcionan las etapas exactas de preparación de la vacuna.

Kelly et al., estudian, en Journal of Medical Virology 11: 257 – 264 (1983), la replicación del virus de la encefalomiocarditis, perteneciente a la familia Picornaviridae, *in vitro*, en varios tipos de células de mamíferos, incluyendo a los fibroblastos y las células de melanoma.

El objeto de la presente invención, es el de presentar un procedimiento para la preparación de un inmunoestimulante con efecto antitumoral, *in vitro*, el cual comprende una cepa de virus no patogénico, con objeto de incrementar la eficacia de supresión de un crecimiento maligno, después de la operación, en caso de la administración de larga duración.

5 El objeto de la invención, se consigue, debido al hecho de que, en el procedimiento de producir el inmunoestimulante, la cepa de virus no patogénico, se obtiene,

- 10 - mediante el aislamiento del virus, el cual se trata del enterovirus del tipo ECHO 7 (*Picomaviridae Enterovirus especie Echovirus*), seguido de
- la adaptación del virus, al tejido tumoral, mediante el paso en serie de éste, en el tejido tumoral, el cual se trata de un melanoblastoma procedente de varios pacientes, y la selección de la cepa que tiene una afinidad para el tumor, a cuyo efecto, la adaptación del virus al tejido tumoral, se lleva a cabo en concordancia con el esquema de propagar el virus propagado en el tejido tumoral, en un cultivo de ensayo de los fibroblastos embrionarios humanos, y de nuevo, pasando el virus en tejido tumoral, en donde, la totalidad de 3 – 10 pasos sucesivos, se lleva a cabo, de una forma alternante, en cultivos finitos procedentes de tumores individuales, y en cultivos de ensayo, y
- 15 - la propagación sucesiva de la cepa adaptada, procediendo a hacer pasar, en el cultivo de fibroblasto embrionario, humano, hasta un título 5 -7 log TCD 50 / 0,1 ml del enterovirus del tipo ECHO-7, después de lo cual, se procede a aislar el cultivo viral propagado,
- 20 - el enterovirus del tipo ECHO-7 obtenido, siendo efectivo, *in vivo*, en la supresión del crecimiento del tumor.

25 El enterovirus (familia *Picomaviridae*, género *Enterovirus*, especie *Echovirus*), es conocido, como uno de los virus de RNA más simples. Éste tiene únicamente 4 polipéptidos estructurales y, correspondientemente en concordancia, no tantos determinantes antígenos (centros activos), para las interacciones con varios clones de la células inmunocompetentes.

30 El efecto antitumoral de este inmunoestimulante, afecta, principalmente, a la etapa humoral del respuesta inmune (linfocitos B). Se conoce el hecho de que, en el caso de la inducción de un proceso maligno, la actividad funcional de los linfocitos B (células B), se suprime antes que aquélla de las células T (linfocitos T).

35 El conjunto de características y rasgos específicos del procedimiento, facilita la adaptación del cultivo no patogénico aislado, al tejido tumoral, de varios pacientes, así como también su propagación. En el caso en el que, el título del virus, sea inferior a un valor de 5 log TCD 50 / 0,1 ml, no se observa el efecto inmunoestimulante, debido al hecho de que, la actividad del cultivo, es demasiado débil.

Si los títulos son mayores de un valor de 7 log TCD 50 / 0,1 ml, se observa la disminución de la actividad del cultivo.

40 Los enterovirus, se recuperan a partir del tracto intestinal de los hombres, principalmente, a partir de los niños sanos de 2 – 5 años de edad, y éstos se aíslan en cultivos primarios embrionarios, humanos. A continuación, se selecciona el serotipo no patogénico *Picomaviridae Enterovirus* ECHO-7. Se utilizan las heces, para recuperar el virus.

Después de que se haya producido el cultivo inicial, se detecta su oncotropismo para el melanoblastoma u otros tumores, en cultivos finitos a corto plazo, procedentes de tumores.

45 El cultivo seleccionado se adapta a los pasos en serie, en tejidos tumorales de melanoblastomas, procedentes de varios pacientes, para incrementar la especificidad del efecto.

La cepa que ha experimentado varios pases, se propaga al título de 5 – 7 log TCD 50 / 0,1 ml, en el cultivo de fibroblastos embrionarios, humanos.

50 La descripción detallada del procedimiento, se facilita abajo, a continuación.

55 El cultivo inicial no patogénico de *Picomaviridae Enterovirus*, tipo ECHO-7, se recupera del tracto intestinal de niños sanos, de 2 – 5 años de edad. Las muestras fecales, se utilizan para la recuperación primaria del virus. La muestra fecal, colocada en frascos estériles, se almacena en el refrigerador, a una temperatura de -10 °C. Para la recuperación del virus, se utiliza una solución salina equilibrada de Hanks, al 20 %, en suspensión. La solución, se centrifuga a una velocidad angular de 300 r.p.m. (revoluciones por minuto), durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se procede a congelar el sobrenadante, y éste se almacena, a dicha temperatura, durante un transcurso de tiempo de 24 horas. A continuación, se procede a descongelar la suspensión, se añaden antibióticos: penicilina – 1000 U/ml, estreptomycin - 250 U/ml, y se incuba, durante un transcurso de tiempo de 1 – 2 horas. La suspensión obtenida, se centrifuga 1 – 2 veces, a 300 r.p.m. durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se procede a congelar de nuevo, el sobrenadante final, después de someterse a ensayo para la esterilidad, y éste se almacena, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre -10 °C y -20 °C.

Mediante el material que contiene el virus producido, se procede a inocular la monocapa de cultivo tripsinizada de fibroplastos embrionarios humanos. Como medio de mantenimiento para cultivos inoculados, se utiliza el Medio 199, con un 2 % de suero de ternero, como medio de crecimiento – Medio 199 con un 10 % de suero de ternero.

5 Después de 1 hora de contacto con las células, la suspensión, se retira, y se procede a la adición de medio de mantenimiento. A continuación, los tubos del cultivo de células, se incuban, a una temperatura de 37 °C y durante un transcurso de tiempo de 2 – 10 días. Durante este período, se llevan a cabo 2 – 3 pasos en serie del material, en cultivos de fibroblastos embrionarios humanos. La incubación de los tubos, en cualquier paso, perdura, hasta la completa degeneración de las células.

10 Después del aislamiento del virus citopatogénico, el material producido, se titula y se serotipan.

El material que contiene el virus citopatogénico se centrifuga a 3000 r.p.m, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos y, a continuación, éste se almacena a una temperatura situada entre -20 °C y – 70 °C.

15 El título del virus en el cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, es el correspondiente a un valor de 5 – 7 log TCD 50 / 0,1 mm.

20 Después del aislamiento, las cepas de virus, se sometieron a test de ensayo, para el oncotropismo en cultivos tumorales finitos.

25 La adaptación del cultivo de virus aislado, se lleva a cabo en el tejido tumoral obtenido a partir de material operatorio obtenido de varios pacientes, los cuales nunca se sometieron a ningún tratamiento. El tejido tumoral, se purifica, a partir del tejido adiposo, de las lesiones necróticas, y de la sangre. El tejido tumoral purificado, se incuba, durante un transcurso de tiempo de 18 – 20 horas, a una temperatura de 0 °C y, a continuación, éste se trocea, en fragmentos de 0,1 – 0,2 mm, y se embebe en medio 199 ó medio Eagle, sin suero (100 mg de tejido / 4 ml de medio).

30 El tejido, se infecta con cultivo de virus  $10^5$  –  $10^5$  TCD 50, y se incuba en termostato, a una temperatura de 37 °C, sin aportación adicional de CO<sub>2</sub>. Se cambian 5 ml de medio fresco, diariamente. El cultivo, se finaliza, cuando se alcanza la muerte de los fragmentos tumorales, lo cual se comprueba morfológicamente y visualmente, en concordancia con el cambio de color del medio.

35 Para la detección de la intensidad de la propagación del virus, se procede a llevar a cabo la titulación del virus, en la fase líquida del cultivo tumoral, del cual se extraen muestras diariamente. La intensidad de la reproducción del virus, se evalúa procediendo a calcular el porcentaje de la cantidad de virus detectado en el cultivo infectado, con respecto a la dosis de infección. En el caso en el que se encuentre la multiplicación de virus, en el tejido tumoral, se procede entonces a centrifugar material procedente de los días de máxima propagación, a una velocidad angular de 3000 r.p.m., durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

40 La adaptación del cultivo, se lleva a cabo en concordancia con el siguiente esquema: el virus propagado en el tejido tumoral, se pasa (se propaga) en el cultivo de ensayo de fibroplastos embrionarios humanos, y se pasa, otra vez, en tejido tumoral. En conjunto, se llevan a cabo 3 – 10 pasos sucesivos, de una forma alternada, en cultivos finitos procedentes de tumores individuales y en cultivos de ensayo.

45 La cepa de virus inicial, se almacena en la fase congelada, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre -20 °C y -70 °C.

50 La propagación de la cepa, se lleva a cabo en un cultivo de fibroblastos embrionarios humanos, hasta que el título, sea de un valor de 5 – 7 log TCD 50 / 0,1 ml, con medio 199, exento de suero, y mediante la adición de antibióticos: penicilina 100 U / ml, estreptomycinina 50 U / ml.

El indicador del valor pH – fenol rojo, pudo añadirse, al medio, en una concentración del 0,002 %.

55 La fase líquida del cultivo infectado de fibroblastos embrionarios humanos, después de la completa degeneración de las células, se centrifuga, a 3000 r.p.m., durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

El inmunoestimulante producido con efecto antitumoral, es un líquido estéril de color rosa. Éste se introduce en viales, a razón de 2 ml ( $2 \times 10^7$  TCD 50) – siendo ésta la dosis para una inyección. La preparación, se almacena en estado congelado.

60 El inmunoestimulante producido, se aplicó para el tratamiento de pacientes con melanoma de piel, maligno (T<sub>1-3</sub>, N<sub>0</sub>, M<sub>0</sub>), después de la eliminación operatoria de bien ya sea el tumor primario, o del tumor primario, conjuntamente con ganglios linfáticos regionales.

65

La preparación, se administra 2 - 4 semanas después de la operación, como inyección parenteral (intramuscular), en la región glútea lateral superior.

5 El esquema de administración, es como sigue: durante los primeros tres meses, una inyección de 2 ml ( $2 \times 10^7$  TDC 50 / día), 3 días, de una forma consecutiva, después de cada recorrido de tratamiento, en un intervalo de tres semanas, en los siguientes tres meses - una inyección / semanalmente. A continuación, hay un intervalo de tres meses, y se repiten inyecciones, mensualmente, dentro de los meses postoperatorios 9º - 12º.

10 La administración de la preparación, podría comenzarse antes de la eliminación del tumor primario - 1 - 2 semanas previamente a la operación: una inyección de 2 ml ( $2 \times 10^7$  TDC 50 / día), durante 3 días, de una forma consecutiva.

Es también posible, así mismo, un período de administración más prolongado - de hasta 2 - 3 años de período postoperatorio, mediante inyecciones mensuales de 2 ml.

15 La administración de la preparación, no provoca, prácticamente, efectos secundarios.

20 Abajo, a continuación, se proporcionan los resultados de ensayos clínicos de la preparación inmunoestimulante propuesta (ISVO - inmunoestimulante de origen viral - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a immunostimulator of viral origin] -), la preparación de origen bacteriano (*Corinebacterium Parvum*) y una preparación química, Decaris (Levamisol), para pacientes con melanoma maligno.

25 El Decaris, se administró en concordancia con el siguiente esquema: tabletas, peroralmente administradas, dos veces por semana, con 3 días de intervalo, durante 8 meses, desde la 2ª - 4ª semana, después de la eliminación del tumor primario.

30 La preparación de C.P., se administró según el siguiente esquema: la inmunoestimulación, se comenzó 1 - 4 semanas después de la operación radical. Durante los primeros cinco días, la preparación, se administró por vía intravenosa, a razón de 1 - 4 mg diarios, en dosificación ascendente. A continuación, durante un transcurso de tiempo de 1 año, la preparación, se administró por vía subcutánea, una vez a la semana, a razón de 1 ml, en 4 puntos, en la región abdominal.

Se procedió a analizar los materiales, con referencia a los pacientes los cuales se encontraban en observación, durante un transcurso de tiempo no inferior a los 3 años.

35 Abajo, a continuación, se proporcionan, en la tabla 1, los datos sobre la supervivencia y los procesos dinámicos, en los pacientes afectados de melanoma cutáneo, después de la operación radical.

Tabla 1

Parámetro observado	C.P.	Inmunoestimulante Decaris	ISVO	Sólo operación
Supervivencia	$\frac{13 : 12^*}{62 \%}$	$\frac{22 : 28}{78,6 \%}$	$\frac{21 : 25}{84 \%}$	54,5 %
Estabilización del proceso	$\frac{10 : 21}{47 \%}$	$\frac{17 : 28}{60,7 \%}$	$\frac{18 : 25}{64\%}$	25,7 %
*- en el numerador, se indica el número de pacientes con resultados positivos con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador - el porcentaje de este valor de relación.				

40 Los datos, demuestran el hecho de que, los mejores resultados de supervivencia, se obtuvieron en el caso de la administración del inmunoestimulante propuesto, basado en el cultivo de enterovirus.

En la Tabla 2, se proporcionan los datos de la dinámica de la mortalidad de los pacientes afectados de melanoma, después de la cirugía y de la inmunoestimulación.

45

Tabla 2

Grupo de pacientes observado	Número de pacientes los cuales murieron durante:		
	el primer año	2 años	3 años
C.P.	$\frac{1 : 21}{5 \%}$	$\frac{6 : 21}{29 \%}$	$\frac{8 : 21}{38 \%}$
Decaris	$\frac{2 : 28}{7 \%}$	$\frac{6 : 28}{21 \%}$	$\frac{6 : 28}{21 \%}$
ISVO	$\frac{0 : 25}{0 \%}$	$\frac{2 : 25}{8 \%}$	$\frac{4 : 25}{16 \%}$
Sólo operación	54,5 %		

\*- en el numerador, se indica el número de pacientes muertos, con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador – el porcentaje de este valor de relación.

5 Puede concluirse, a raíz de los datos obtenidos, el hecho de que, la inmunoestimulación proporcionada por el inmunoestimulante propuesto, un significativo incremento de la supervivencia de los pacientes, puesto que, durante el primer año, no murió nadie, de entre el grupo tratado con ISVO, mientras que, en los otros grupos, murieron un 5 % y un 7 %, respectivamente.

10 La diferencia en la mortalidad, se observa así mismo, también, después de los 2 años, en comparación con la segunda mejor preparación, Decaris, en donde, el ISVO, indujo unos resultados 1,3 veces mejores.

La preparación propuesta, disminuyó así mismo, también, la frecuencia de la progresión del proceso, después de la operación radical.

15 Abajo, a continuación, en la Tabla 3, se proporcionan los datos de la frecuencia del progreso del proceso, en los pacientes afectados de melanoma, después de la operación radical y la inmunoestimulación.

Tabla 3

Período de tiempo	Preparación			Sólo operación
	C.P.	Decaris	ISVO	
3 años	$\frac{11 : 21}{53 \%}$	$\frac{11 : 28}{39 \%}$	$\frac{29 : 25}{36 \%}$	74,3 %

\*- en el numerador, se indica el número de pacientes con progreso del proceso, con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador – el porcentaje de este valor de relación.

20 Tal y como podrá verse a raíz de la tabla, la progresión más lenta de proceso, fue, en el caso de un tratamiento, la correspondiente al tratamiento con la preparación propuesta.

El modelo patrón de la diseminación del tumor – melanoma cutáneo después una operación radical, en dependencia de la preparación utilizada, se proporciona en la Tabla 4.

25

Tabla 4

Inmunoestimulante	Recaídas	Metástasis			
		Subcutánea	Ganglios linfáticos	Pulmones	Cerebro
C.P.	$\frac{1 : 11}{9 \%}$	$\frac{4 : 11}{36 \%}$	$\frac{6 : 11}{55 \%}$	$\frac{7 : 11}{63 \%}$	$\frac{3 : 11}{27 \%}$
Decaris	no	$\frac{1 : 8}{12,5 \%}$	$\frac{4 : 8}{50 \%}$	$\frac{2 : 8}{25 \%}$	$\frac{1 : 8}{12,55 \%}$
ISVO	no	$\frac{3 : 9}{33 \%}$	$\frac{4 : 9}{45 \%}$	$\frac{1 : 9}{11 \%}$	$\frac{1 : 9}{11 \%}$

\*- en el numerador, se indica el número de pacientes con recaídas (metástasis), con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador – el porcentaje de este valor de relación.

30 Los datos proporcionados en la Tabla 4, indican el hecho de que, en el caso de un tratamiento con la preparación propuesta, la metástasis, son mayormente subcutáneas y en ganglios linfáticos, las cuales podían detectarse y eliminarse de una forma relativamente fácil. Las metástasis en los pulmones, se encontraron de una forma 6 y 2,5 veces más raramente, que en el caso de un tratamiento con otras preparaciones conocidas.

El modelo patrón del progreso de la enfermedad, entre los pacientes los cuales murieron, se proporciona en la Tabla 5.

Tabla 5

Grupo observado	Número de pacientes	Duración de la estabilización (meses)	Período de diseminación (meses)	Duraciones de la supervivencia (meses)
C.P.	9	13	9	22
Decaris	6	10	5	15
ISVO	10	17	12	29

- 5 Los datos proporcionados en la Tabla 6, indican el hecho de que, la preparación propuesta, extiende de una forma significativa, el período de estabilización y el período de diseminación, pero, la duración de la supervivencia, se prolongó durante un transcurso de tiempo de 12 meses más, que la correspondiente en el caso de Decaris, y durante un transcurso de tiempo de 7 meses más, que la correspondiente en el caso de *Corinebacterium Parvum*.
- 10 Abajo, a continuación, en la Tabla 6, se facilitan los datos de supervivencia de pacientes afectados de cáncer gástrico, después de una operación radical, en la fase 3ª de la enfermedad.

Tabla 6

Período de observación	Supervivencia de los pacientes (frecuencia en %)	
	Operación + ISVO	Operación
2 años	$\frac{15 : 21^*}{71,41}$	45,8
5 años	$\frac{10 : 21^*}{47,6}$	24,2

\*- en el numerador, se indica el número de pacientes vivos, con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador – el porcentaje de este valor de relación.

- 15 Puede concluirse, a raíz de los resultados presentados, el hecho de que, en los pacientes tratados con la preparación propuesta, la frecuencia de la supervivencia, es 1,5 – 2 veces mayor, en comparación con sólo la operación.

- 20 Abajo, a continuación, en la Tabla 7, se facilitan los datos de supervivencia de pacientes afectados de cáncer de recto, después de una operación radical.

Tabla 7

Período de observación	Supervivencia de los pacientes (frecuencia en %)	
	Operación + ISVO	Operación
5 años	$\frac{10 : 14^*}{71,2}$	58,2

\*- en el numerador, se indica el número de pacientes vivos, con respecto al número total de pacientes observados; en el denominador – el porcentaje de este valor de relación.

- 25 Tal y como puede verse, a raíz de los resultados, la administración de la preparación propuesta, incrementaba la supervivencia en un porcentaje del 14 %.

Abajo, a continuación, se proporcionan los resultados del control de estatus inmune, durante el tratamiento, con el inmunoestimulante propuesto (ISVO).

- 30 1. Reacción de DTH al antígeno tumoral asociado a melanoma

- 35 No había cambios significativos en la frecuencia de una reacción positiva de DTH (hipersensibilidad de tipo retardado – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a delayed-type hypersensitivity] -), en los pacientes tratados con ISVO, durante los primeros 6 meses (50 - 60 %). Después de reanudar la inmunoestimulación (9 - 12 meses), este índice, se elevó en un porcentaje del 10 % de los pacientes, lo cual significa que, la frecuencia, de la reacciones normales de DTH, no cambian ni se incrementan, durante la estimulación con ISVO.

En el caso de un tratamiento con Decaris, la frecuencia de las reacciones normales de DTH, experimentan cambios, no existe reacción, en un 35 % de los pacientes, después de un transcurso de tiempo de 2 meses. En una parte de los pacientes, la frecuencia de esta reacción, experimenta cambios significativos (20 - 30 %).

- 5 Puesto que la reacción de DTH, muestra la capacidad del organismo para distinguir, reaccionar y rechazar el antígeno asociado al tumor, la estabilización o la elevación de este índice, son indicadores favorables, pero las fluctuaciones bruscas y la disminución de esta reacción, son indicaciones no favorables del estatus inmune en curso de inmuoestimulación. Así, de este modo, en concordancia con este índice, el ISVO, funciona mejor que el Decaris.

10 2. RILA para antígeno tumoral asociado a melanona

El tratamiento con ISVO, en el período postoperatorio, no provoca fluctuaciones bruscas de reacciones. La frecuencia de detección de esta reacción, en el transcurso de la inmuoestimulación, tiene una tendencia a incrementarse. Entre los pacientes tratados con Decaris, la frecuencia de detección de esta reacción, en el curso de la estimulación, se redujo desde un 60 % a un 30 %, lo cual significa que, en el final del recorrido, los leucocitos de únicamente un 30 % de los pacientes, reconocieron y reaccionaron con el antígeno del melanoma. RILA así como la DTRH, exhiben la capacidad de los linfocitos T, para distinguir y reaccionar con el antígeno asociado a tumor. La ausencia o disminución de esta reactividad, debe verse con un debilitamiento de la resistencia tumoral.

20 Debe mencionarse el hecho de que, después de que haya cesado el tratamiento con Decaris, este índice, vuelve a su valor inicial.

3. El inhibidor de adherencia de leucocitos en suero

25 Durante el curso de la inmuoestimulación con ISVO, la frecuencia de detección de este índice, aumenta, desde un 35 %, en el inicio del curso (trascuro), hasta un 80 %, en el final. En el grupo de pacientes tratados con Decaris, la frecuencia de detección de éste índice, se reduce, desde un 40 %, en el inicio del recorrido, hasta un 20 % en el final del transcurso de la estimulación.

30 El inhibidor de adherencia de leucocitos detectados en RILA, se detecta, en un 60 – 80 % de personas sanas. El mismo índice, se encuentra en pacientes afectado de melanoma, después de una operación radical y un tratamiento con ISO, y en la etapa o fase de estabilización. El inhibidor, desaparece, durante el proceso de diseminación, lo cual significa que, esta presencia del inhibidor de la adherencia de leucocitos, en suero, es uno de los índices de estatus inmune normal. La aparición de éste, en un 45 % de los pacientes tratados con ISVO, se contempla con el efecto de inmuoestimulación positivo.

A efectos comparativos, en el grupo tratado con Decaris, después de 4 meses de tratamiento, el inhibidor, se encuentra únicamente en un porcentaje del 20 % de los pacientes.

40 4. El factor de bloqueo en suero, detectado en RILA

El factor de bloqueo, muestra el estado de bloqueo de células inmunocompetentes que participan en los procesos de inmunidad antitumoral.

45 Este factor, se detecta en un 25 - 30 % de los pacientes, después de que se haya extirpado la lesión de melanoma primario. En los pacientes tratados con ISVO, en el 6º mes de inmuoestimulación, este factor, se detecta únicamente en un 10 % de los pacientes.

50 El factor de bloqueo en suero, se reduce así mismo, también, durante los primeros 2 meses de estimulación con Decaris, y éste se detecta en un 10 % de los pacientes, pero, en el 6º mes de la inmuoestimulación, ese factor, se detecta en únicamente un 30 - 40 % de los pacientes, incluyendo a aquellos pacientes, los cuales no presentaban el factor de bloqueo, después de la extirpación del tumor.

5. Anticuerpos antivirales en suero

55 Durante los primeros meses de la inmuoestimulación con ISVO, hay un fuerte incremento de anticuerpos antitumorales en suero, los cuales se detectan mediante reacción de neutralización y reacción de inhibición de hemaglutinación. Durante este período, los títulos de anticuerpos antivirales, se incrementaron desde 1 : 20, hasta 1 : 5000 – 10000. Después de que se terminara la inmuoestimulación (6 – 9 mes), los títulos de anticuerpo, cayeron y, a continuación, se convirtieron en estables, con la reactivación de la inmuoestimulación (9 – 12 meses).

60 Esto indica que tiene lugar una inmunogénesis viral activa, en los organismos de los pacientes. El período de inmunogénesis viral, es favorable, para la expresión de inmunidad antitumoral, vía recurrencia y normalización de procesos, bloqueados mediante el crecimiento (tumor) maligno.

65



Esto significa que, la administración de ISVO, en período postoperatorio, después de una extirpación radical del melanoma primario, o bien convierte en estable las reacciones inmunes del organismo, o bien las activa.

5 Aparte de ello, no se observaron signos de hiperestimulación ni de reacciones autoinmunes. Los índices de estatus inmunes, presentan una evidencia en cuanto al hecho de que, no se observaron los efectos tóxicos, durante la administración parenteral de larga duración, de ISVO.

10 El inmunoestimulante propuesto, basado en una cepa de enterovirus adaptada a tumor, no patogénica, del tipo ECHO *Picomaviridae Enterovirus*, es efectivo en la supresión del crecimiento tumoral.

Este tipo de virus, pertenece a los virus sin envoltura y, debido a ello, éste no porta antígenos de origen celular, lo cual podría inducir a reacciones autoinmunes.

15 De una forma adicional, es característico de este tipo de virus, la seguridad genética, basada en la organización del genoma, el cual no se integra en el genoma de células huésped, y no se recombina con los genomas de otros virus.

El procedimiento desarrollado para producir el inmunoestimulante, asegura la máxima actividad de la preparación obtenida.

20 El inmunoestimulante propuesto, suprime, de una forma activa, el crecimiento tumoral maligno, en el caso de recaídas. De una forma adicional, las metástasis, son predominantemente subcutáneas y en los ganglios linfáticos, las cuales podrían extirparse de una forma comparativamente fácil.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un procedimiento para la preparación de un inmunoestimulante con efecto antitumoral, el cual comprende una cepa de virus no patogénico, caracterizado por el hecho de que, esta cepa, se obtiene,
- mediante el aislamiento del virus, el cual se trata del enterovirus del tipo ECHO 7 (*Picomaviridae Enterovirus specie Echovirus*), seguido de
  - la adaptación del virus, al tejido tumoral, mediante el paso en serie de éste, en el tejido tumoral, el cual se trata de un melanoblastoma procedente de varios pacientes, y la selección de la cepa que tiene una afinidad para el tumor, a cuyo efecto, la adaptación del virus al tejido tumoral, se lleva a cabo en concordancia con el esquema de propagar el virus propagado en el tejido tumoral, en un cultivo de ensayo de los fibroblastos embrionarios humanos, y de nuevo, pasando el virus en tejido tumoral, en donde, la totalidad de 3 – 10 pasos sucesivos, se lleva a cabo, de una forma alternante, en cultivos finitos procedentes de tumores individuales, y en cultivos de ensayo, y
  - la propagación sucesiva de esta cepa adaptada, procediendo a hacer pasar, en el cultivo de fibroblasto embrionario, humano, hasta un título 5 -7 log TCD 50 / 0,1 ml del enterovirus del tipo ECHO-7, después de lo cual, se procede a aislar el cultivo viral propagado,
  - el enterovirus del tipo ECHO-7 obtenido, siendo efectivo, *in vivo*, en la supresión del crecimiento tumoral.
- 10
- 15
- 20 2.- El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que, la citada cepa de enterovirus, se ha aislado del tracto intestinal de un niño de 2 - 5 años de edad.
- 3.- Enterovirus no patogénico del tipo ECHO 7 (*Picomaviridae Enterovirus specie Echovirus*), obtenido mediante el procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2.