

33 001020 00

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03001020 00000000 Folios: 92
Fecha (MRE) 2003-01-09 17:14:05
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTM
Dependencia: 2080 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☐ Capítulo I ☒ Capítulo II			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania Dirección 51368 Leverkusen República Federal de Alemania Domicilio Leverkusen, República Federal de Alemania	IDENTIFICACION CC ☐ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre EMILIO FERRERO Dirección Carrera 4ª No 72-35 Teléfono 347 38 11 Fax 217 92 11 E-mail <u>clientes@camyp.com</u> Domicilio Bogotá, Colombia	IDENTIFICACION CC ☒ NIT ☐ CE ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>438.019</u> T P. <u>31 929</u>	
4 INVENTOR (ES) (72)	1- Claudia HIRTH-DIETRICH Stockmannstraße 127, 42115 Wuppertal, República Federal de Alemania 3- Angela SIEGLING 7, rue Francois Bonvin F-75015 Paris Francia 5- Olaf WEBER 539 Amity Road Woodbridge, Connecticut 08525, Estados Unidos de América 2- Tobias SCHLAPP Gerstenkamp 10, 51061 Köln, República Federal de Alemania 4- Andreas KNORR Trilser Graben 10 40699 Erkrath República Federal de Alemania 6- Gudrun THIES Boeddinghausstr 13, 42329 Wuppertal República Federal de Alemania		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No <u>PCT/EP01/07978</u> Publicación Internacional No <u>WO 02/004019 A3</u> Fecha <u>11 de julio de 2001</u> Fecha <u>17 de enero de 2002</u>			
6 Título (54) <u>USO DE CEPAS DE PARAPOXVIRUS OVIS FRENTE A FIBROSIS DE ORGANOS</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 39/275</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>DE</u> <u>DE</u>	(32) Fecha <u>11 de julio de 2000</u> <u>8 de mayo de 2001</u>	(31) Número de Solicitud <u>100 33 581 0</u> <u>101 22 233 5</u>

9

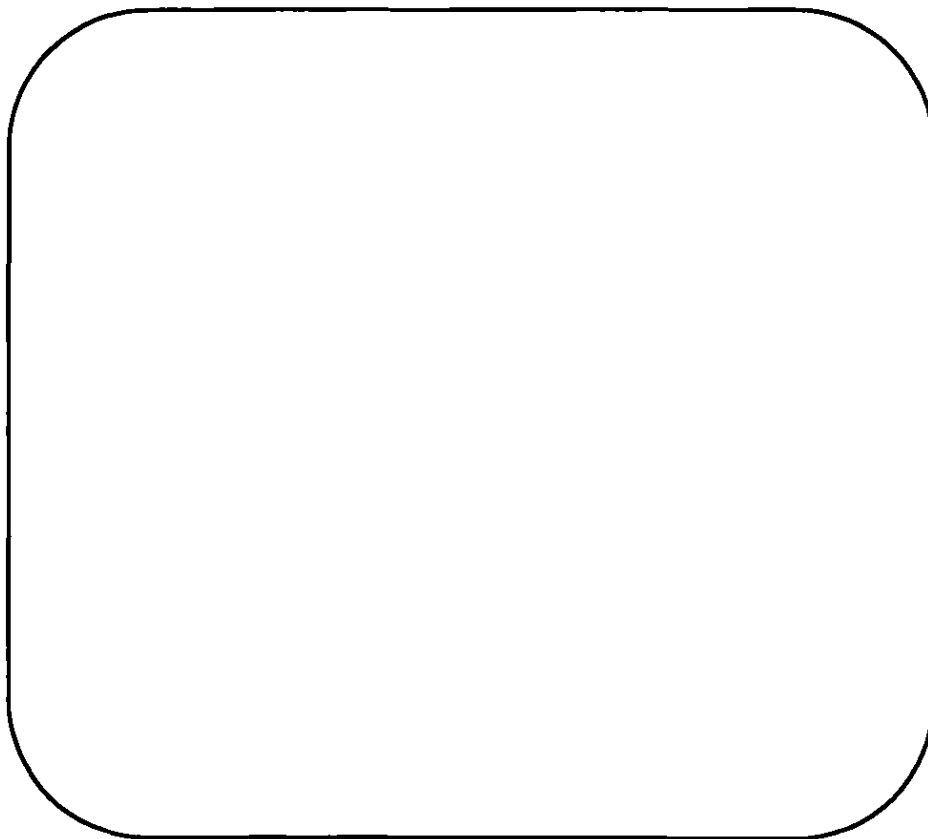
Comprobante de pago No 03-104 Fecha 2 de enero de 2003

10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA.

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE EMILIO FERRERO

FIRMA 
C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

Handwritten mark

MRE/mrm-Id-1206

CONSULADO DE COLOMBIA

C E R T I F I C A C I O N

No 145

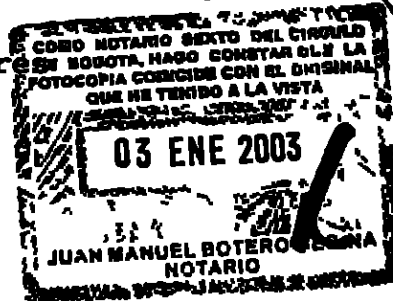
Bonn, 8 de agosto de 1996

El suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares de Colombia en Bonn, vistos los documentos presentados por los interesados, CERTIFICA Que el señor Dirk Heiderhoff quien como Notario en Leverkusen autentico la firma de los signatarios DR ROLF BRAUN y DR JOACHIM GREMM del documento precedente, ejercian en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que la empresa BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT esta constituida de acuerdo con las leyes de la Republica Federal de Alemania y cumple su objeto conforme a las mismas segun el Registro Comercial HRB 1122 del Tribunal de Primera Instancia de Leverkusen, que los señores BRAUN y GREMM, quienes firmaron el documento precedente, son los representantes legales de la empresa arriba mencionada

El suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento

Pagado el impuesto de timbre
y derechos consulares
Valor US\$106,00 = DM\$169,60

JUAN PABLO GONZALEZ
Segundo Secretario
Encargado de las Funciones Consulares



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
POR EL CONTENIDO
DEL DOCUMENTO
1996 AGO 23 A 53
DET DE LAS FUNCIONES
CONSULARES
JUAN PABLO GONZALEZ

CUATRO AL MINISTRO DE
RELACIONES EXTERIORES
BOGOTA
1996 AGO 23
JUAN PABLO GONZALEZ
SEGUNDO SECRETARIO
ENCARGADO DE LAS FUNCIONES
CONSULARES

Dirk Heiderhoff

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)

BAYER AKTIENGESellschaft

of/domiciliado (s) en D-51368 Leverkusen,
GERMANY,

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831, EMILIO FERRERO, tpa. 31929 y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal o el primero o segundo suplente, en su caso o ambos declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero, y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo contencioso-administrativo y judicial así como los tribunales de arbitramento en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales, el registro de marcas de fábrica colectivas defensivas, de servicio lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen, su renovación traspaso cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos. b) Las acciones de competencia desleal protección del consumidor oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares concesión de licencias la tutela la protección de secretos industriales y en general los juicios civiles penales administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan suscribir este poder, transigir conciliar admitir los hechos del proceso desistír cancelar recibir renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831 EMILIO FERRERO, tpa. 31929 and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second in such cases the principal representative or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad, and in case of impediment the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence by the principal, the first or second alternate depending on case and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs, the registration of trademarks, collective defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin, its renewal assignment change of name, domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights. b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement granting of licenses, the action for writ mandamus the protection of trade secrets and in general the civil penal, and administrative suits relating to those rights, actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate admit the facts of the case, desist, cancel, receive resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy

31st July 1996

in/en Leverkusen

BAYER AKTIENGESellschaft

Signature

Firma

CAVELIER ABOGADOS

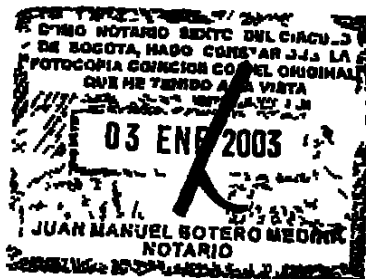
WITNEDERE (MINUTA N° 121125)

LEGALIZACION

El Señor Consul de Colombia debe expedir un *certificado consular* sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que esta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Consul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a *consular certificate* the legal existence of the company which is the Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of company purposes, and (3) that the persons who use the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect show the Consul the evidence to prove the above facts and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA Según los artículos 65 del C de P C y 480 del C de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante

computer certificate
only when
actual exercise
persons who exercise
to. To this effect,
the above facts

URNr 799/1996

Ich beglaubige die vor mir vollzogenen Unterschriften der Herren

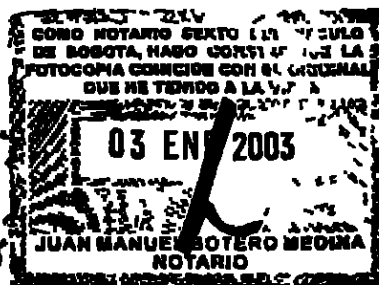
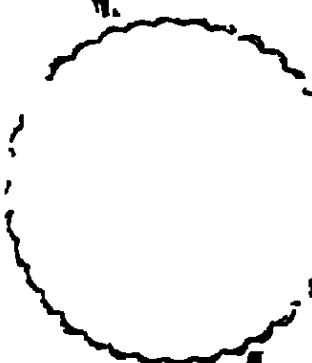
- 1 Dr Rolf Braun, geschäftsansässig in D 51368
Leverkusen, Bayerwerk,
- 2 Dr Joachim Gremm , geschäftsansässig in D 51368
Leverkusen, Bayerwerk,

- persönlich bekannt -

Ich bescheinige aufgrund Einsicht vom heutigen Tage in das Handelsregister des Amtsgerichts Leverkusen - HRB 1122 -, daß die genannten Herren berechtigt sind, die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen als Prokuristen gemeinschaftlich zu vertreten

Leverkusen, den 31 Juli 1996

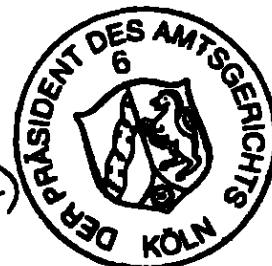
H. Lin
Notar



Die Echtheit der vorstehenden Unterschrift
des Notars *Dirk Schiedhoff* in Leverkusen
sowie die Echtheit des beigefügten Dienst-
siegels - siegels werden hiermit bestätigt.
Zugleich wird bescheinigt daß der Notar zur
Vornahme der Amtshandlung befugt war

Köln, den 02 Aug 1996
Der Präsident des Landgerichts

R. Wohrnick
(Dr. Wohrnick)



TRADUCCION OFICIAL No 5424

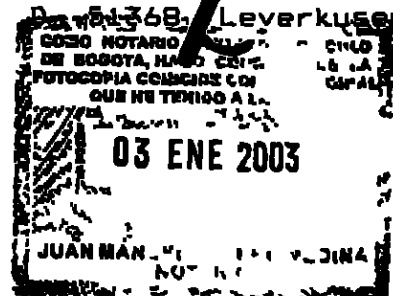
de un documento escrito en Aleman, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente -

(A continuación de la representación y poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa 831, EMILIO FERRERO tpa, 31929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciliados en la Carrera 4 No 72-35, Bogotá, Colombia, el 31 de julio de 1996 por los señores Dr Rolf Braun y Dr Joachim Gremm, apoderados de la Bayer Aktiengesellschaft, Leverkusen, RFA)

Protocolo notarial 1799/1996

Certifico la autenticidad de las firmas puestas ante mi por los señores

- 1 Dr Rolf Braun, domiciliado en D 51368 Leverkusen, Bayerwerk,
- 2 Dr Joachim Gremm, domiciliado en D 51368 Leverkusen, Bayerwerk,
- a quienes conozco en persona-



8

Certifico por haber tenido a la vista el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Leverkusen - HRB 1122 - que los señores mencionados están facultados, en su calidad de apoderados, para representar conjuntamente a la Bayer Aktiengesellschaft, domiciliada en Leverkusen

Leverkusen, 31 de julio de 1996

Fdo firma ilegible

Notario

(Hilo y oblea notarial en relieve)

Dirke Heiderhoff - Notario de Leverkusen

(corso)

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del notario de Leverkusen, Dirke Heiderhoff, y la del sello oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto oficial

Colonia, 02 de agosto de 1996

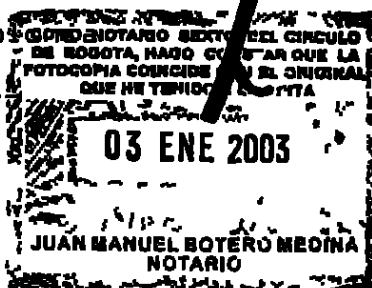
El Presidente del Juzgado Municipal

Fdo firma ilegible

(Dr Wohlmich)

(sello redondo en tinata)

El Presidente del Juzgado Municipal de Co

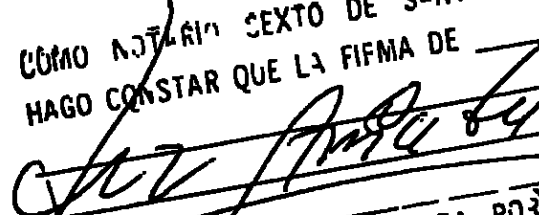
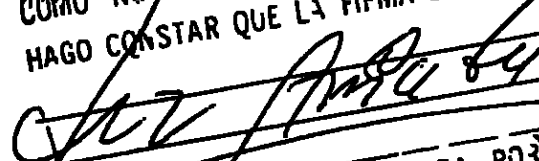


EN ESPAÑOL La legalización de las firmas antecedentes por el
Consulado de Colombia en Bonn bajo el No 145 del 08 de agosto de
1996 y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
bajo el No 198692 del 23 de agosto de 1996

Pagados Impuesto de timbre y derechos consulares US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los
archivos de estas oficinas para su confrontación

Santafé de Bogotá, 2 de septiembre de 1996

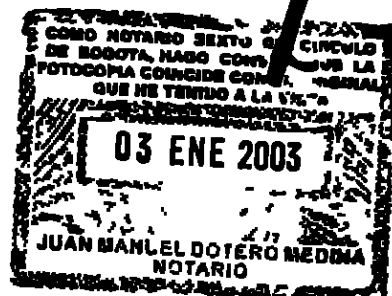
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE

C. C. 
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLOS)
EN ESTA NOTARIA 09 SET. 1996
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

firmas autose



JEFE DE OFICINA
SANTAFE DE BOGOTA, D.C.
09 SET. 1996

205398
09 SET. 1996
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES



P

CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX (57) 11 2358850
CABLES CAVELEYES
TELEX 43479

EDIFICIO SISKI
CARRERA 41 No 72 35
BOGOTA 8 COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL CAVE
TELEFONO (57) 11 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E S D

Poderdante BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Poder conferido el 31-07-96

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No 31 929, con todas las facultades que me fueron conferidas

Hago la anterior sustitucion conforme al articulo 66 delCodigo de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento

Señor Jefe,

GERMAN CAVELIER

T P A No 832

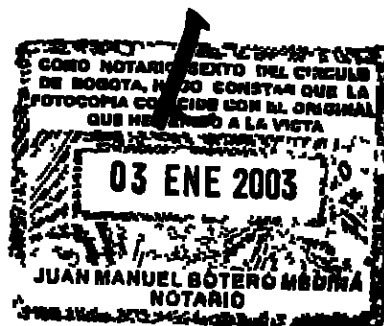
C C No 2 877 924 de Bogota

Acepto

EMILIO FERRERO

T P A No 31 929

C C No 438 019 de Usaquen



2e-780-2

NOTARIA PÚBLICA DE BOGOTÁ
RECORDACIÓN DE HECHOS PERSONAL
Santibáñez de Bogotá D.C.
Ante el Jefe de la Oficina
NOTARIAL, el día 17 de Julio de 1992
Comparecieron (comparecieron) a:

[Firma]

[Firma]

quien(es) exhibió (exhibieron) el (los) documento(s) que

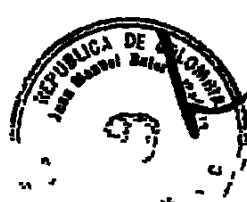
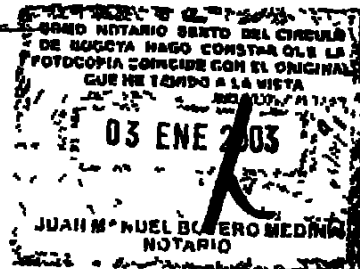
y la(s) copia(s) de los mismos, los cuales son:

77852 7787929

donde se
aparece que
el (los)
firmante(s) que
comparecieron, a la(s) vista, que

[Firma]

[Firma]



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17 Januar 2002 (17 01 2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/004019 A3

(51) Internationale Patentklassifikation A61K 39/275
A61P 43/00 // 1/16 C12N 7/08

(21) Internationales Aktenzeichen PCT/EP01/07978

(22) Internationales Anmeldedatum
11 Juli 2001 (11 07 2001)

(25) Einreichungssprache Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache Deutsch

(30) Angaben zur Priorität
10033581 0 11 Juli 2000 (11.07.2000) DE
10122233 5 8 Mai 2001 (08.05 2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) Bestimmungsstaaten (regional) ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE] 51368 Leverkusen (DE)

(72) Erfinder und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) HIRTH-DIETRICH, Claudia [DE/DE] Stockmannsmühle 127 42115 Wuppertal (DE) SCHLAPP Tobias [DE/DE] Gerstenkamp 10 51061 Köln (DE) SIEGLING Angela [DE/FR] 7 rue Francois Bonvin F 75015 Paris (FR) KNORR Andreas [DE/DE] Trilser Graben 10 40699 Erkrath (DE) WEBER, Olaf [DE/US] 539 Amity Road, Woodbridge CT 06525 (US) THEISS, Gudrun [DE/DE] Boeddinghausstrasse 13 42329 Wuppertal (DE)

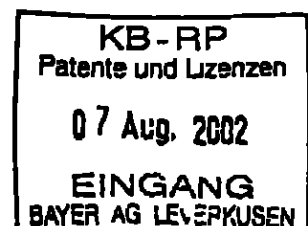
(74) Gemeinsamer Vertreter BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 51368 Leverkusen (DE)

Veröffentlicht

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material eingereicht gemäß Regel 13bis genannt von der Beschreibung

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts 1 August 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/004019 A3

(54) Title USE OF STRAINS OF THE PARAPOX OVIS VIRUS AGAINST ORGAN FIBROSIS

(54) Bezeichnung VERWENDUNG VON STÄMMEN DES PARAPOX VIRUS OVIS GEGEN ORGANFIBROSEN

(57) Abstract The invention relates to the human use of inactivated parapox viruses for the prophylaxis and the treatment of illnesses associated with increased collagen deposition said illnesses affecting inner organs e.g. the liver and also skin and the appendages thereof. Liver fibrosis or liver cirrhosis resulting from viral hepatitis or ethanol induced liver diseases such as alcoholic fibrosis are especially relevant.

(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft die Humanverwendung von inaktivierten Parapoxviren bei der Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, die mit erhöhter Kollagenablagerung einhergehen, wobei sowohl innere Organe wie z.B. die Leber als auch die Haut und ihre Anhangsgebilde betroffen sein können. Insbesondere sind betroffen Leberfibrose bzw. Leberzirrhose im Gefolge von Virushepatitis oder Ethanol induzierten Lebererkrankungen sowie Zystische Fibrose.

CA 34714

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/275 A61P43/00 //A61P1/16,C12N7/08

According to International Patent Classification (IPC) and to national classification and IPC

B FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification symbols indicated by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum to indicate the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ EMBASE, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, BIOSIS

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 38724 A (MAYR ANTON) 23 October 1997 (1997-10-23) the whole document example 9	1-5,7-10
A	WO 95 22978 A (MAYR ANTON) 31 August 1995 (1995-08-31) the whole document	1-5,7-10
P,X	WO 00 69455 A (BAYER AG, SCHLAPP TOBIAS (DE), SIEGLING ANGELA (DE), WEBER OLAF (D) 23 November 2000 (2000-11-23) page 10 -/--	1,2,8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex

Special categories of cited documents

- A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- E earlier document but published on or after the international filing date
- L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 January 2002

Date of mailing of the international search report

17/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 apo nl
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Wagner, R

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box L2

Claim No 6

Claim No 6 relates to parts or fragments of viruses. As it relates to a disproportionately large number of possible fragments of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of PCT Article 6 and/or can be considered disclosed under the terms of PCT Article 5, this claim could not be searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary report (PCT Rule 66 1(e)). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (PCT Article 19) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/07978

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738724	A	23-10-1997	AT 203678 T	15-08-2001
			AU 706729 B2	24-06-1999
			AU 2885897 A	07-11-1997
			BR 9708679 A	04-01-2000
			CA 2251690 A1	23-10-1997
			CN 1215996 A	05-05-1999
			WO 9738724 A1	23-10-1997
			DE 19780300 D2	17-06-1999
			DE 59704194 D1	06-09-2001
			DK 885013 T3	05-11-2001
			EP 0885013 A1	23-12-1998
			ES 2125846 T1	16-03-1999
			HU 9901299 A2	28-07-1999
			JP 2000501114 T	02-02-2000
			NO 984782 A	15-12-1998
			PL 329353 A1	29-03-1999
			US 6162600 A	19-12-2000
WO 9522978	A	31-08-1995	DE 4405841 C1	05-01-1995
			AT 153242 T	15-06-1997
			AU 690625 B2	30-04-1998
			AU 1416795 A	11-09-1995
			BR 9506882 A	19-08-1997
			CA 2182207 A1	31-08-1995
			CN 1142187 A	05-02-1997
			DE 59402826 D1	26-06-1997
			DK 669133 T3	14-07-1997
			WO 9522978 A1	31-08-1995
			EP 0669133 A1	30-08-1995
			ES 2102081 T3	16-07-1997
			FI 963277 A	22-08-1996
			GR 3023508 T3	29-08-1997
			HU 75545 A2	28-05-1997
			JP 2873880 B2	24-03-1999
			JP 9504803 T	13-05-1997
			KR 196204 B1	15-06-1999
			NO 963462 A	20-08-1996
WO 0069455	A	23-11-2000	NZ 278079 A	26-01-1998
			PL 316024 A1	23-12-1996
			SI 669133 T1	31-10-1997
WO 0069455	A	23-11-2000	DE 19922407 A1	16-11-2000
			AU 4403900 A	05-12-2000
			WO 0069455 A2	23-11-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/275 A61P43/00 //A61P1/16,C12N7/08

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data PAJ, EMBASE, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 38724 A (MAYR ANTON) 23 Oktober 1997 (1997-10-23) das ganze Dokument Beispiel 9	1-5,7-10
A	WO 95 22978 A (MAYR ANTON) 31 August 1995 (1995-08-31) das ganze Dokument	1-5,7-10
P,X	WO 00 69455 A (BAYER AG, SCHLAPP TOBIAS (DE), SIEGLING ANGELA (DE), WEBER OLAF (D) 23 November 2000 (2000-11-23) Seite 10	1,2,8

-/--



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

- A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L Veröffentlichung, die geeignet ist einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2 Januar 2002

Abschlussdatum des internationalen Recherchenberichts

17/01/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentkanal 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3015

Bevollmächtigter Beauftragter

Wagner, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
A	FRIEDMAN SCOTT L "Evaluation of fibrosis and hepatitis C" THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, Bd 107, Nr 6B, 1999, Seiten 27s-30s, XP001022493 das ganze Dokument -----	1-5,7-10

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I 2

Ansprüche Nr 6

Der Anspruch 6 bezieht sich auf Teile oder Bruchstücke von Viren. Da es sich um eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Fragmente handelt, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann, konnte dieser Anspruch nicht recherchiert werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66 1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zu der selben Patent Familie gehören

Internationales Abkürzungen

PCT/EP 01/07978

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9738724	A	23-10-1997	AT	203678 T	15-08-2001
			AU	706729 B2	24-06-1999
			AU	2835897 A	07-11-1997
			BR	9708679 A	04-01-2000
			CA	2251690 A1	23-10-1997
			CN	1215996 A	05-05-1999
			WO	9738724 A1	23-10-1997
			DE	19780300 D2	17-06-1999
			DE	59704194 D1	06-09-2001
			DK	885013 T3	05-11-2001
			EP	0885013 A1	23-12-1998
			ES	2125846 T1	16-03-1999
			HU	9901299 A2	28-07-1999
			JP	2000501114 T	02-02-2000
			NO	984782 A	15-12-1998
			PL	329353 A1	29-03-1999
			US	6162600 A	19-12-2000
WO 9522978	A	31-08-1995	DE	4405841 C1	05-01-1995
			AT	153242 T	15-06-1997
			AU	690625 B2	30-04-1998
			AU	1416795 A	11-09-1995
			BR	9506882 A	19-08-1997
			CA	2182207 A1	31-08-1995
			CN	1142187 A	05-02-1997
			DE	59402826 D1	26-06-1997
			DK	669133 T3	14-07-1997
			WO	9522978 A1	31-08-1995
			EP	0669133 A1	30-08-1995
			ES	2102081 T3	16-07-1997
			FI	963277 A	22-08-1996
			GR	3023508 T3	29-08-1997
			HU	75545 A2	28-05-1997
			JP	2873880 B2	24-03-1999
			JP	9504803 T	13-05-1997
			KR	196204 B1	15-06-1999
			NO	963462 A	20-08-1996
			NZ	278079 A	26-01-1998
WO 0069455	A	23-11-2000	DE	19922407 A1	16-11-2000
			AU	4403900 A	05-12-2000
			WO	0069455 A2	23-11-2000

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



INTERNATIONAL UNION FOR THE PROTECTION OF PATENT RIGHTS

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17 Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04019 A2

not sk

- (51) Internationale Patentklassifikation^{*} A61K 39/12 (74) Gemeinsamer Vertreter BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 51368 Leverkusen (DE)
- (21) Internationales Aktenzeichen PCT/EP01/07978 (81) Bestimmungsstaaten (*national*) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW
- (22) Internationales Anmeldedatum 11 Juli 2001 (11.07.2001) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*) ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Einreichungssprache Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität
10033581 0 11 Juli 2000 (11.07.2000) DE
10122233 5 8 Mai 2001 (08.05.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE] 51368 Leverkusen (DE)
- (72) Erfinder und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*) HIRTH DIETRICH Claudia [DE/DE] Stockmannsmühle 127 42115 Wuppertal (DE); SCHLAPP Tobias [DE/DE] Gerstenkamp 10 51061 Köln (DE); SIEGLING, Angela [DE/FR] 7 rue Francois Bonvin F 75015 Paris (FR); KNORR, Andreas [DE/DE] Triller Graben 10 40699 Erkrath (DE); WEBER Olaf [DE/US] 539 Amity Road, Woodbridge CT 06525 (US); THEISS, Gudrun [DE/DE] Boeddinghausstrasse 13 -2329 Wuppertal (DE)
- Veröffentlicht
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
— mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material eingereicht gemäß Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen

LA 34 714

(54) Title USE OF STRAINS OF THE PARAPOX OVIS VIRUS AGAINST ORGAN FIBROSIS

(54) Bezeichnung VERWENDUNG VON STÄMMEN DES PARAPOXVIRUS OVIS GEGEN ORGANFIBROSEN

(57) Abstract The invention relates to the human use of inactivated parapox viruses for the prophylaxis and the treatment of illnesses associated with increased collagen deposition said illnesses affecting inner organs e.g. the liver and also skin and the appendages thereof. Liver fibrosis or liver cirrhosis resulting from viral hepatitis or ethanol induced liver diseases such as cystic fibrosis are especially relevant.

(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft die Humanverwendung von inaktivierten Parapoxviren bei der Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, die mit erhöhter Kollagenablagerung einhergehen, wobei sowohl innere Organe wie z.B. die Leber als auch die Haut und ihre Anhangsgebilde betroffen sein können. Insbesondere sind betroffen Lebertfibrose bzw. Leberzirrhose im Gefolge von Virushepatitis oder Ethanol induzierten Lebererkrankungen sowie Zystische Fibrose.

WO 02/04019 A2

Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis gegen Organfibrosen

- Die vorliegende Erfindung betrifft die Humanverwendung von inaktivierten Parapoxviren bei der Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, die mit erhöhter Kollagenablagerung einhergehen, wobei sowohl innere Organe, wie z.B. die Leber, als auch die Haut und ihre Anhangsgebilde betroffen sein können. Insbesondere sind betroffen Leberfibrose bzw. Leberzirrhose im Gefolge von Virushepatitis oder Ethanol-induzierten Lebererkrankungen sowie Zystische Fibrose
- 10 Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Humanverwendung von Isolaten von Parapoxvirus ovis, beispielsweise der Stämme D1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, New Zealand (NZ) Isolaten, z.B. NZ2, NZ7 und NZ10, einschließlich des von D1701 abgeleiteten Baypamun®
- 15 Betroffen sind neben den Ausgangsstämmen auch die durch Passagierung und/oder Adaptation an bestimmte Zellen, beispielsweise WI 38, erhaltenen Abkömmlinge. Betroffen sind neben den kompletten Viren auch Teile oder Bruchstücke dieser Viren. Unter Teilen sind mittels geeigneter Vektoren beispielsweise Vaccinia in geeigneten Systemen wie Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente zu verstehen. Unter Bruchstücken versteht man die durch biochemische Aufreinigung wie Chromatografie erhaltenen Fraktionen oder die nach Anwendung physikalischer Methoden wie Aufschluss mit Ultraschall erhaltenen Partikel
- 20
- 25 Es ist bekannt, daß Parapoxvirus die nonspezifische Immunreaktion von Vertebraten stimulieren kann. Baypamun®, eine Präparation von chemisch inaktiviertem Parapoxvirus ovis, Strain D1701 wird für die Prophylaxe, Metaphylaxe und Therapie von Infektionserkrankungen sowie zur Prävention von stressinduzierten Erkrankungen bei Tieren eingesetzt.

Das Patent DE 3 504 940 A (Mavr, Anton) lehrt die günstige Wirkung von Baypamun® bei Zuständen wie der Immunsuffizienz durch energiereiche Bestrahlung, Chemotherapie, AIDS, Immunsuppression, altersbedingten Schäden sowie detoxifizierende Effekte, nicht aber die unmittelbare Reduktion einer Leberfibrose

5 Weiterhin lehrt DE 3 504 940, dass Baypamun® als Adjunkt die Wirksamkeit einer Tumorthherapie unterstützt, und dass es Neugeborene vor durch unzureichende maternale Immunabwehr hervorgerufenen Erkrankungen schützt.

Ausgehend vom vorliegenden Stand der Wissenschaft wurde jetzt überraschenderweise gefunden, daß die Gabe inaktivierter Parapoxviren die Leberfibrose verringern bzw. verhindern kann. Diese Wirkung wurde in Tiermodellen bei der Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Leberfibrose gefunden, die auf einer toxischen Leberschädigung beruht, und bei der durch artfremdes Serum induzierten Leberfibrose, bei der es nicht zu einer Leberentzündung kommt. Überraschend ist

10 außerdem das Ausmaß des therapeutischen Effekts. Die in der Leberfibrose überschüssige Kollagen-Produktion wird im Tetrachlorkohlenstoff-Modell zu 60 %, im Serum-Modell fast vollständig gehemmt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen aus Langzeitexperimenten konnte nach akuter Gabe von Tetrachlorkohlenstoff

15 jetzt gezeigt werden, daß Baypamun® und die aus den oben genannten Stämmen von Parapoxvirus ovis erhaltenen Zubereitungen die Transformation der hepatischen Sternzellen zum kollagenproduzierenden Myofibroblasten-Typ hemmen

20

Leberfibrose bzw. Leberzirrhose kann durch unterschiedliche Noxen wie beispielsweise virale Infektionen und Alkoholabusus ausgelöst werden, doch münden

25 die unterschiedlichen Pathomechanismen in eine gemeinsame Endstrecke, die Kollagen-Produktion, ein. Wie die tierexperimentellen Ergebnisse aus den oben geschilderten nicht-infektiösen Modellen zeigen, verhindert die Gabe inaktivierter Parapox-Viren überraschenderweise die Kollagenablagerung unabhängig von der auslösenden Noxe

Parapox-Viren eröffnen damit ein neuartiges Therapieprinzip zur Einwirkung auf die allen zur Fibrose führenden Erkrankungen gemeinsame Endstrecke

5 Dieser Effekt lässt eine besonders effektive Therapie auch der viral induzierten Leberfibrose mit Zubereitungen von Parapoxviren erwarten, da für solche Zubereitungen zusätzliche immunstimulatorische Wirkungen bekannt sind

10 Die jetzt aufgefundene starke antifibrotische Wirkung von Baypamun® öffnet die Möglichkeit, Baypamun® oder Zubereitungen von NZ2 als Referenz Standard für die Beurteilung der antifibrotischen Effekte in Assays zur Auffindung antifibrotischer Substanzen einzusetzen

15 Inaktivierte Parapox-Viren oder deren Abkömmlinge und Zubereitungen erhalten aus den oben genannten Stämmen besitzen also ein universelles antifibrotisches Wirkspektrum und sind daher nicht nur für die Prophylaxe und Therapie fibrotischer Erkrankungen der Leber, sondern auch bei fibrotischen Erkrankungen anderer Organe, wie beispielsweise der Lunge, des Pankreas, des Herzens und der Haut geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Isolaten von Parapoxviren bei der Prophylaxe und Behandlung von Leberfibrose und Leberzirrhose

20 Je nach klinischer Fragestellung wird das Therapeutikum auf der Basis von Parapoxvirus systemisch, also beispielsweise intramuskulär, subcutan, intra-peritoneal, intravenös, per os, per inhalationem oder lokal appliziert. Das Parapoxvirus liegt dabei entweder aufgereinigt und lyophilisiert vor und wird
25 unmittelbar vor der Applikation in einem geeigneten Lösungsmittel suspendiert oder es liegt in einer anderen geeigneten Formulierung vor oder es liegt in einer magensaftresistenten oder einer anderen oralen Applikationsform vor

30 Mehrere Applikationen oder Langzeitbehandlung nach Zeitschemen, die den Erfordernissen der klinischen Fragestellung entsprechen, können dabei notwendig sein

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Isolaten von Parapoxviren zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen. Isolate von Parapoxviren, erhalten aus den Stämmen

5 D1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, sowie den New Zealand (NZ) Stämmen zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen. Bevorzugt verwendet werden New Zealand (NZ) Stämme, die Stämme NZ2, NZ7 und NZ10 zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des

10 Menschen, wobei der Stamm NZ2 besonders bevorzugt ist. Darüber hinaus können die vorstehend beschriebenen Parapox Viren durch Passagierung oder Adaptation an geeigneten Zellen modifiziert werden und solche durch Passagierung oder Adaptation erhaltenen Parapox Viren zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen verwendet werden, wobei

15 zur Passagierung oder Adaptation beispielsweise humane Zellen wie WI-38, MRC-5, bovine Zellen, wie BK-K13A47/Reg oder MDBK und ovine Zellen, wie MDOK verwendet werden können. Auch Teile oder Bruchstücken der vorstehend genannten Parapox Viren können zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen verwendet werden. Unter Teilen

20 wird verstanden mittels geeigneter Vektoren wie Vacciniaviren in geeigneten Systemen wie Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente und unter Bruchstücken die durch biochemische Aufreinigung wie Chromatografie erhaltenen Fraktionen der exprimierten oder physikalisch, beispielsweise durch Einwirkung von Ultraschall, aufgeschlossenen viralen Partikel. Ein

25 weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend beschriebenen Stämme von Parapoxvirus ovis oder der daraus wie vorstehend beschrieben erhaltenen Modifikate in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen sowie die Verwendung von Baypamun

30 allein oder in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln

und pharmazeutischen Zubereitungen mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen. Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der vorstehend beschriebenen Stämme von Parapoxvirus ovis oder der daraus wie vorstehend beschrieben erhaltenen Modifikate in Kombination mit
5 anderen Mitteln in einer Formulierung für die orale Applikation, z.B. in magensaftresistenten Kapseln.

Weiter ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung von Baypamun® oder Zubereitungen von NZ2 als Referenz für die Beurteilung der antifibrotischen Effekte
10 in Assays zur Auffindung antifibrotischer Substanzen.

Der hier beispielhaft genannte Parapoxvirus ovis NZ-2 wurde am 10. Juli 2001 bei der European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, United Kingdom hinterlegt.
15 Die Hinterlegungsnummer lautet

Beispiel 1

Wirkung von Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701, Baypamun®

5 Methodik

Baypamun® Trockensubstanz, eine Präparation gewonnen aus chemisch inaktiviertem Parapoxvirus Ovis, Strain D 1701, wurde nach Vorschrift mit Aqua pro injektionen gelöst (Titer bezogen auf die TCID₅₀ (50 % tissue culture infective dose) ca 10⁷ pro ml)

10

Als Placebo-Lösung wurde den Tieren der Kontrollgruppen eine Polygeline-Lösung mit dem gleichen Proteingehalt wie in der Baypamun® - Lösung verabreicht.

15

Pro Tier und Applikation wurden 0,5 ml Lösung i.p. verabreicht. Die Applikation wurde drei mal pro Woche, jedoch nie an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt

Baypamun®, wurde in zwei Tiermodellen mit unterschiedlicher Genese der Fibrose getestet, dem Tetrachlorkohlenstoff-Modell und dem Schweineserum-Modell

20

Die chronische Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff ist eine Standardmethode zur experimentellen Auslösung einer Leberfibrose mit anschließender Zirrhose (McLean EK, McLean AEM, Sutton PM Instant cirrhosis Br J Exp Pathol 1969, 50 502-506) Es ist allgemein als Modell der menschlichen Leberfibrose und -zirrhose anerkannt. Es wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Zur maximalen

25

Induktion des mikrosomalen Metabolismus von Tetrachlorkohlenstoff erhielten die Tiere 1 g/l Isoniazid mit dem Trinkwasser bereits eine Woche vor dem Beginn der Behandlung. Tetrachlorkohlenstoff wurde oral jeden fünften Tag in einer Dosis von 0,1 ml/100g Körpergewicht (Tetrachlorkohlenstoff Mineralöl = 1 : 1) gegeben. Die Tiere wurden nach siebenwöchiger Behandlung getötet und untersucht. Die Behand-

30

lung mit Baypamun® wurde parallel zur Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung durchgeführt.

Die Behandlung mit heterologem Serum, z.B. Schweineserum bei Ratten, ist ebenfalls eine häufig in der Literatur angewendete Methode zur Auslösung einer Leberfibrose mit anschließender Zirrhose, die im Gegensatz zu anderen Modellen nur eine minimale Schädigung und Entzündung der Leberparenchymzellen hervor-

5 ruft (Bhunchet, E. and Wake, K. (1992) Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis Hepatology 16 1452-1473) Weibliche Sprague Dawley Ratten wurden 2 x wöchentlich mit 0,5 ml/Tier sterilem Schweineserum (Sigma) i.p. behandelt, Kontrolltiere mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (2 x wöchentlich 0,5 ml/Tier i.p.) Die Behandlung mit Baypamun®

10 erfolgte parallel zur Schweineserum-Behandlung, jedoch nie am selben Tag. Nach sieben Wochen Behandlung wurden die Tiere getötet und die Lebern zur Quantifizierung des Kollagengehalts entnommen.

Für die histologische Untersuchung des Lebergewebes wurden standardisierte

15 transverse Gewebezylinder (etwa 10 x 2 mm) aus dem rechten Vorderlappen der Leber gestanzt. Gefrierschnitte wurden für die Detektion von durch Leberfibrose hervorgerufenem Narbenkollagen mit 0,1%iger Pikrosiriusrot-Lösung gefärbt.

Fast Green wurde als Gegenfärbung zur Kontrastverstärkung eingesetzt. Das Ausmaß

20 der Leberfibrose wurde in jedem Schnitt als prozentualer Anteil der Pikrosiriusrot-gefärbten Fläche an der gesamten Meßfläche bestimmt. Die Parameter der videomikroskopischen Farbdetektion wurden standardisiert und im gesamten Experiment konstant gehalten. 64 Felder eines standardisierten Rasters von 31 mm² wurden bei 50-facher Endvergrößerung ausgemessen.

25 Zur Quantifizierung des Ausmaßes der Transformation von hepatischen Sternzellen (HSC, auch Itozellen oder Vitamin-A-Speicherzellen) nach akuter Behandlung von Ratten mit Tetrachlorkohlenstoff wurden die α -Glattmuskelaktin-positiven Zellen immunhistochemisch detektiert. Die α -Glattmuskelaktin-positive Fläche wurde bei

30 200-facher Endvergrößerung in jedem Schnitt in jeweils 16 zentrolobulären Feldern

von $248 \times 180 \mu\text{m}$ festgestellt. Die Transformation von HSC in kollagen- und wachstumsfaktorproduzierende myofibroblastartige Zellen ist bekanntlich der entscheidende Schritt bei der Auslösung der Leberfibrose. Daher sind transformierte HSC ein Frühindikator fibrogener Aktivität in der Leber.

5

Für die halbautomatische Morphometrie wurde ein Leica Quantimed 500MC (Leica Deutschland) eingesetzt.

10 Zur OH-Prolin-Bestimmung wurden je 50-100 mg Lebergewebe getrocknet und mit 6N HCl ca. 17 Stunden gekocht. Nach Verdampfen der Säure im Vakuum-Trockenschrank wurde der Rückstand mit 5 ml Aqua dest. gelöst und filtriert. 200 μl der filtrierten Lösung wurden mit 200 μl Ethanol und 200 μl Oxidationslösung (7%ige wässrige Chloramin T Hydrat-Lösung 1 : 4 mit Acetat-Citrat-Puffer pH 6,0 verdünnt) 25 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden 400 μl Ehrlich's

15 Reagenz (12 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 20 ml Ethanol + 2,74 ml konzentrierte Schwefelsäure in 20 ml Ethanol) zugegeben. Nach 3 Stunden Inkubation bei 35°C wurde die Absorption bei 573 nm gemessen. Für die Eichreihe wurden wässrige OH-Prolin (Sigma)-Lösungen verwendet. Der OH-Prolin-Gehalt der Leberproben wurde in mg pro g Leber-Trockengewicht berechnet.

20

Zur Verfolgung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen wurde die Konzentration an reduziertem α -Tocopherol (α -TOC), einem Radikalfänger, in der Leber und die Aktivität des radikalsensitiven Enzyms 7-Ethoxyresorufin-Deethylase (EROD) im Serum gemessen. Beide Parameter sind charakteristischerweise bei der

25 Tetrachlorkohlenstoffvergiftung herunterreguliert und erlauben eine Abschätzung des Schweregrades der oxidativen Gewebeschädigung.

Der Leberstatus der Tiere wurde durch Messung einiger Standardserumparameter bestimmt.

Alaninaminotransferase (ALT), alkalische Phosphatase (AP), Aspartataminotransferase (AST), γ -Glutamyltransferase (GGT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Gesamtbilirubin (TBIL)

Ergebnisse

5

Die Behandlung mit Baypamun® vermindert signifikant das Ausmaß der fibrotischen Degeneration der Lebern von tetrachlorkohlenstoffbehandelten Ratten (Abb 1) Daneben ist eine fast komplette Hemmung der HSC-Transformation zu beobachten (Abb 2) Die Anzahl proliferierender Nichtparenchymzellen in den Lebern Baypamun®-behandelter Tiere ist deutlich verringert (Abb 3) Nichtparenchymzellen schließen HSC und die gleichfalls an der Fibrogenese beteiligten Kupferzellen ein

10

Die Serumindikatoren für eine hepatozelluläre Schädigung wie ALT, AP, AST, 15 , GGT, GLDH und TBIL (Tabelle 1) zeigen eine Tendenz zur Normalisierung

20

Die gleiche Verminderung der EROD- und α -Tocopherolkonzentrationen in der Kontrollgruppe und der mit Baypamun® behandelten Gruppe belegt die Anwesenheit von toxischen reaktiven Sauerstoffradikalen durch die Tetrachlorkohlenstoffvergiftung in beiden Gruppen (Tabelle 1 und 2) Daher kann ein "antifibrotischer" Effekt von Baypamun® durch eine detoxifizierende Wirkung ausgeschlossen werden

25

Im Serum-Modell zeigt Baypamun® eine nahezu vollständige Unterdrückung der Fibrose (Abb 4) Sowohl der Hydroxyprolin-Gehalt als auch die mit Siriusrot anfärbbare Fläche der Lebern liegt bei den mit Baypamun® behandelten Ratten fast auf dem Niveau der gesunden Kontrolltiere, während sie bei den Serum-behandelten Kontrollratten um ein Mehrfaches erhöht ist Der durch die Schwemeserumbehandlung induzierte Anstieg des Kollagengehalts beträgt in der Baypamun-Gruppe nur 10 % des entsprechenden Wertes in der Kontroll-Gruppe

Beispiel 2

Parapoxvirus ovis, Strain NZ 2

5 Methodik

NZ2-Virus wurde in Wannenstapeln vermehrt. Hierzu wurden BK-Klon3A Zellen in Zellkulturschalen (37°C) 3 bis 5 Tage in EMEM 2 gr + 10 % FCS angezogen bis der Zellrasen 90 bis 100 % konfluent war. Pro Wannenstapel wurden 4 Zellkulturschalen als Inokulum verwendet und mit Medium (EMEM 2 gr + 10% FCS) auf ein Volumen von 2,5 Liter aufgefüllt. Nach 3 bis 5 Tagen Inkubation bei 37°C (90 bis 100 % konfluenter Zellrasen) wurde das Medium gegen EMEM 2 g ohne Serumzusatz ausgetauscht und die Kultur mit NZ2-Virus (MOI 0,001 bis 0,01) infiziert.

15 Nach Erreichen von 100% CPE (Inkubation 37°C, ca. 7 bis 8 Tage) wurde das Virus geerntet. Hierzu wurde die Virussuspension in sterile Mediensäcke abgefüllt und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde die Suspension bei 37°C im Brutraum aufgetaut und durch eine Tiefenfiltration (Porengröße 5µm) zellbefreit. Hierauf wurde die Virussuspension durch Ultrafiltration (100 kDa cutoff) um den Faktor 20 bis 40 aufkonzentriert. Alternativ kann das Virus durch Ultrazentrifugation (Ti45 30 000 rpm, 4°C, 60 Min) aufkonzentriert werden.

25 Der durch die Aufkonzentrierung erreichte Titer des in der Suspension enthaltenen Virus wurde durch Titration auf BK-Klon3A Zellen bestimmt. Nachdem der Virustiter auf 6,0 mittels EMEM Medium ohne FCS eingestellt wurde, wurde das Virus 2h bei 58°C hitzeinaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch eine Inaktivierungskontrolle auf BK-Klon3A Zellen kontrolliert.

30 Parapoxvirus ovis, Strain NZ2 wurde in dem bereits in Beispiel 1 verwendeten Modell der Schweineserum-induzierten Leberfibrose bei Ratten untersucht.

Weibliche Sprague Dawley Ratten wurden 2 x wöchentlich mit 0,5 ml/Tier sterilem Schweineserum (Sigma) i.p. behandelt, Kontrolltiere mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (2 x wöchentlich 0,5 ml/Tier i.p.) Strain NZ 2 wurde 3 x wöchentlich in den Dosierungen $1,5 \times 10^5$ bzw. $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀/Tier i.p. verabreicht (Applikationsvolumen 0,5 ml/Tier). Für die untere Dosis wurde das Ausgangsmaterial mit Zellkulturmedium (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma) verdünnt. Kontrolltiere wurden mit Zellkulturmedium behandelt. Die Behandlung mit Strain NZ 2 erfolgte parallel zur Serum-Behandlung, jedoch nie am selben Tag. Nach 7 Wochen Behandlung wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und die Leberfibrose sowohl morphometrisch als auch über den OH-Prolin-Gehalt quantifiziert. Die Methodik hierzu ist bereits in Beispiel 1 beschrieben.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kollagenbestimmungen sind in Abb. 5 dargestellt. Überraschenderweise kann die Behandlung mit Strain NZ 2 das Entstehen der Leberfibrose unterdrücken. Die Serum-behandelten Kontroll-Tiere zeigen im Vergleich zu gesunden Tieren eine deutliche Erhöhung des OH-Prolin-Gehalts und des Sinusrot-färbbaren Kollagens. Dieser Anstieg wird durch NZ 2 dosisabhängig reduziert. Überraschend ist auch das Ausmaß des Effekts. Die Dosis 5×10^5 TCID₅₀ reduziert den Anstieg des Kollagengehalts in der Leber auf weniger als 10 % des Kontrollwertes. Eine qualitative Bewertung der histologischen Präparate ergab, dass der Anteil der Tiere mit Kollagen-Septen von 93 % (14/15) auf 33 % (5/15) in der $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀-Gruppe und auf 0 % in der $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀-Gruppe gesenkt wird.

Beispiel 3

Antifibrotische Wirkung von PPVO nach oraler Verabreichung.

- 5 PPVO wurde als trockenes Lyophilisat in magensaftresistenten Kapseln (Elanco, Indianapolis, USA) formuliert.

Vier Gruppen von je sechs Versuchstieren wurden wie folgt behandelt Eine Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt lediglich eine magensaftresistente Kapsel (ohne
10 PPVO) oral verabreicht, und zusätzlich sterile Kochsalzlösung (0,5 ml/Tier) i p injiziert Bei Gruppe 2 wurde eine magensaftresistente Kapsel (ohne PPVO) zusammen mit 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff / Tier oral verabreicht und 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung i p injiziert Tiere der Gruppe 3 erhielten wiederum eine
15 magensaftresistente Kapsel (ohne PPVO) zusammen mit 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff / Tier oral verabreicht. Die Tiere der Gruppe 3 erhielten außerdem PPVO D1701 (Dosis 5×10^6 TCID₅₀ / Tier) in 0,5 ml Aqua pro injekhone i p injiziert Gruppe 4 erhielt PPVO D1701 (Dosis 5×10^6 TCID₅₀ / Tier, in einer
20 magensaftresistenten Kapsel formuliert) zusammen mit 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff oral verabreicht Tiere der Gruppe 4 erhielten außerdem 0,5 ml sterile Kochsalzlösung i p injiziert.

Nach 48 Stunden wurden die Lebern entnommen und in repräsentativen Gewebeschnitten die α -Glattmuskelaktin (α -SMA) -positive zentrolobuläre Fläche in % der
25 gesamten Messfläche immunhistochemisch für jedes Tier bestimmt (Johnson S J, Hines JE, Burt AD Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury a quantitative analysis Int J Exp Path. 1992, 73 765-772) Dieser Wert ist ein Maß für die Transformation der Lebersternzellen

Es wurden 2 Versuchsreihen nach obiger Beschreibung durchgeführt. Die Versuchsergebnisse der ersten Versuchsreihe sind in Tabelle 3, die Ergebnisse der 2. Versuchsreihe sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

- 5 In Versuchsreihe 1 ist der Anteil der α -SMA positiven zentrilobulären Fläche in Lebergewebe von Tieren, die PPVO D1701 i.p. appliziert bekamen (Gruppe 3) unerklärlicherweise (und entgegen der sonstigen experimentellen Erfahrung) höher als bei Tieren, die kein PPVO verabreicht bekamen. Aus diesem Grunde wurde die Versuchsreihe 2 als Wiederholungsexperiment durchgeführt.

10

- In beiden Versuchsreihen wurde übereinstimmend und überraschenderweise nach oraler Gabe von PPVO D1701 (jeweils Gruppe 4) eine ca. 50 %ige Hemmung der Transformation gegenüber der Kontrollgruppe (jeweils Gruppe 2) festgestellt. In der 2. Versuchsreihe ist die Hemmung der Transformation nach oraler Gabe von PPVO
15 D1701 (Gruppe 4) ähnlich effektiv wie bei peritonealer Verabreichung von PPVO D1701 (Gruppe 3).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass PPVO seine antifibrotische Wirkung auch nach oraler Gabe entfaltet.

20

Tabelle 1

Einfluß von Baypamun® auf Serumparameter des Leberstatus und Indikatoren einer Intoxikation							
	ALT	AST	AP	GGT	GLDH	TBIL	EROD
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	µmol/l	nmol g x min
Kontrolle	49 1	45 7	162 8	0 8	12 5	1 6	0 30
SEM	3 7	8 7	14 76	0 2	7 9	0 2	0 02
Tetrachlorkohlenstoff	95 6	92 4	392 7	6 1	37 1	2 9	0 15
SEM	14 7	14 1	43 0	1 3	14 8	0 3	0 01
T + Baypamun®	72 0	65 9	329 5	4 5	18 2	1 9	0 17
SEM	9 9	9 1	26 9	0 8	4 0	0 2	0 03

ALT	Alaninaminotransferase	GLDH	Glutamatdehydrogenase
AST	Aspartataminotransferase	TBIL	Gesamtbilirubin
AP	alkalische Phosphatase	EROD	7-Ethoxyresorufindeethylase
GGT	γ-Glutamyltransferase		

Tabelle 2

Einfluß von Baypamun®	
auf Leber-α-Tocopherol	
	α-Tocopherol nmol / g Gewebe
Kontrolle	73 1
SEM	2 2
Tetrachlorkohlenstoff	35 7
SEM	2 3
T + Baypamun®	38 5
SEM	6 1

Taballe 3

Einfluss von PPVO nach intraperitonealer oder oraler Gabe auf die Transformation von Lebersternzellen nach Gabe einer fibrogenen Dosis Tetrachlorkohlenstoff

5 (Versuchsreihe 1)

Fibrose	Applikation	DOSIS	α -SMA (%)
Gruppe 1 Intakt	Leerkapsel oral + Aqua pro injektione 1 p	---	0.28 ± 0.04
Gruppe 2 Tetrachlor- kohlenstoff	Leerkapsel oral - Aqua pro injektione 1 p	---	2.76 ± 0.79
Gruppe 3 Tetrachlor- kohlenstoff	PPVO in Aqua pro injektione 1 p + Leerkapsel oral	5×10^6 TCID ₅₀ / Tier	5.05 ± 2.00
Gruppe 4 Tetrachlor- kohlenstoff	PPVO in Kapsel oral + Aqua pro injektione 1 p	5×10^6 TCID ₅₀ / Tier	1.46 ± 0.34

Tabelle 4

Einfluss von PPVO nach intraperitonealer oder oraler Gabe auf die Transformation von Lebersternzellen nach Gabe einer fibrogenen Dosis Tetrachlorkohlenstoff (Versuchsreihe 2)

Fibrose	Applikation	DOSIS	α -SMA (%)
Intakt Gruppe 1	Leerkapsel oral + Aqua pro injektionen 1 p	—	0.20 ± 0.04
Tetrachlor- kohlenstoff Gruppe 2	Leerkapsel oral + Aqua pro injektionen 1 p	—	3.18 ± 0.56
Tetrachlor- kohlenstoff Gruppe 3	PPVO in Aqua pro injektionen 1 p + Leerkapsel oral	5×10^6 TCID ₅₀ /Tier	1.22 ± 0.35
Tetrachlor- kohlenstoff Gruppe 4	PPVO in Kapsel oral + Aqua pro injektionen 1 p	5×10^6 TCID ₅₀ /Tier	1.55 ± 0.34

PCT

Original (für EINREICHUNG) gedruckt am 10.07.2001 01:21:22 PM

0-1	Formular PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2.91 (aktualisiert 01.01.2001)
0-2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34714-WO
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material, der/das in der Beschreibung genannt ist	
1-1	Seite	5
1-2	Zeile	11
1-3	Angaben betr. Hinterlegung	
1-3-1	Name der Hinterlegungsstelle	European Collection of Cell Cultures
1-3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom
1-3-3	Datum der Hinterlegung	10 Juli 2001 (10.07.2001)
1-3-4	Eingangsnummer	ECACC
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten, für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1-6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein) <i>ja</i>	11 JUL 2001 (11.07.01)
0-4-1	Bevollmächtigter Bediensteter	Sabine Aulhardt <i>Aulhardt</i>

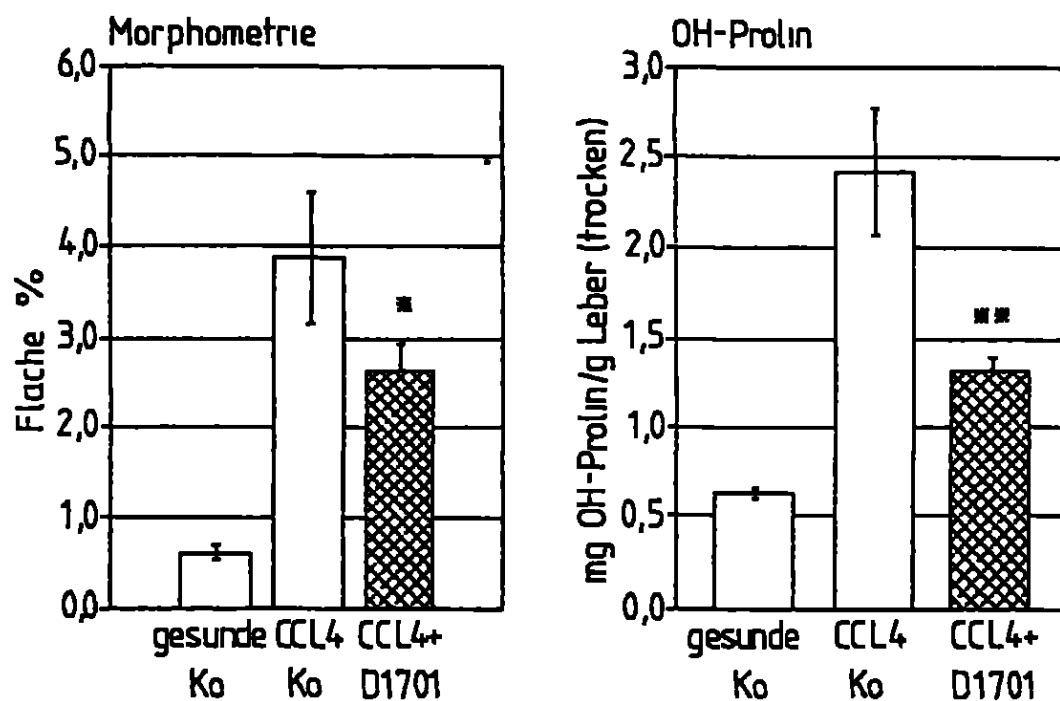
VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0-5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim Internationalen Büro eingegangen	15 NOV 2001 (15.11.01)
0-5-1	Bevollmächtigter Bediensteter	

Patentansprüche

- 1 Verwendung von Isolaten von Parapoxviren zur Herstellung von Arznei-
mitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des
5 Menschen
- 2 Verwendung von Isolate von Parapoxviren, beispielsweise der Stämme D
1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, sowie der New
Zealand (NZ) Stämme zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender
10 oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des Menschen.
- 3 Verwendung von Isolaten von Parapoxviren gemäß Anspruch 1-2, wobei als
New Zealand (NZ) Stämme die Stämme NZ2, NZ7 und NZ10 zur Herstellung
von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf
15 Organfibrosen des Menschen verwendet werden
- 4 Verwendung von durch Passagierung oder Adaptation an geeignete Zellen
modifizierte Parapox Viren der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arznei-
mitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des
20 Menschen
- 5 Verwendung von durch Passagierung oder Adaptation an geeignete Zellen
modifizierte Parapox Viren der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arznei-
mitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen des
25 Menschen, wobei zur Passagierung oder Adaptation humane Zellen wie WI-
38, MRC-5, bovine Zellen, wie BK-K13A47/Reg oder MDBK und ovine
Zellen, wie MDOK verwendet werden
- 6 Verwendung von Teilen oder Bruchstücken der Viren gemäß Anspruch 1-5
30 zur Herstellung von Arzneimitteln mit vorbeugender oder heilender Wirkung
auf Organfibrosen des Menschen, wobei unter Teilen mittels geeigneter

- 5 Vektoren wie Vacciniaviren in geeigneten Systemen wie Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente und unter Bruchstücken die durch biochemische Aufreinigung wie Chromatografie erhaltenen Fraktionen der exprimierten oder physikalisch aufgeschlossenen viralen Partikel zu verstehen sind.
- 7 Verwendung von einem der Isolate entsprechend Anspruch 1-6 in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen mit vorbeugender oder heilender Wirkung
10 auf Organfibrosen des Menschen
- 8 Verwendung von Parapox ovis D 1701 allein oder in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen mit vorbeugender oder heilender Wirkung auf Organfibrosen
15 des Menschen.
- 9 Verwendung von Parapox ovis D 1701 oder Zubereitungen von NZ2 als Referenz-Standard für die Beurteilung antifibrotischer Effekte in Assays zur Auffindung antifibrotischer Substanzen.
20
- 10 Verwendung von Parapox ovis D 1701 entsprechend Anspruch 8, wobei die pharmazeutischen Zubereitungen und Arzneimittel für die orale Verabreichung geeignet sind
25

Fig 1

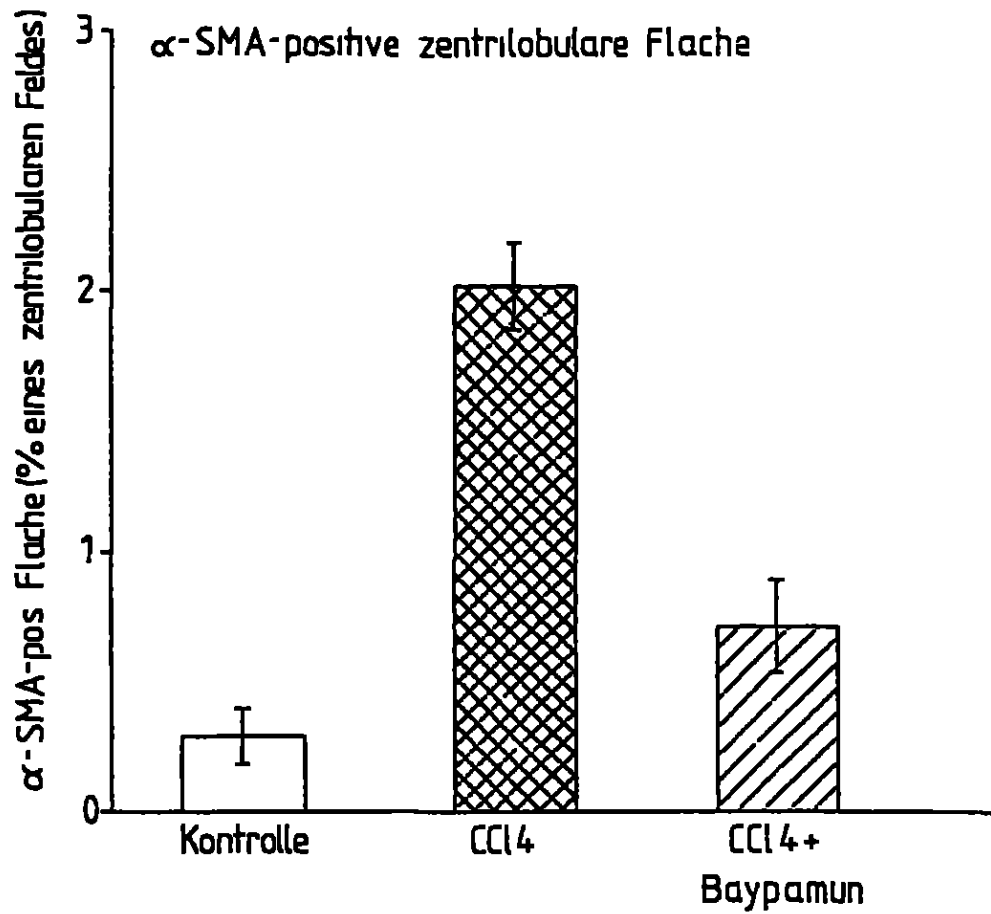
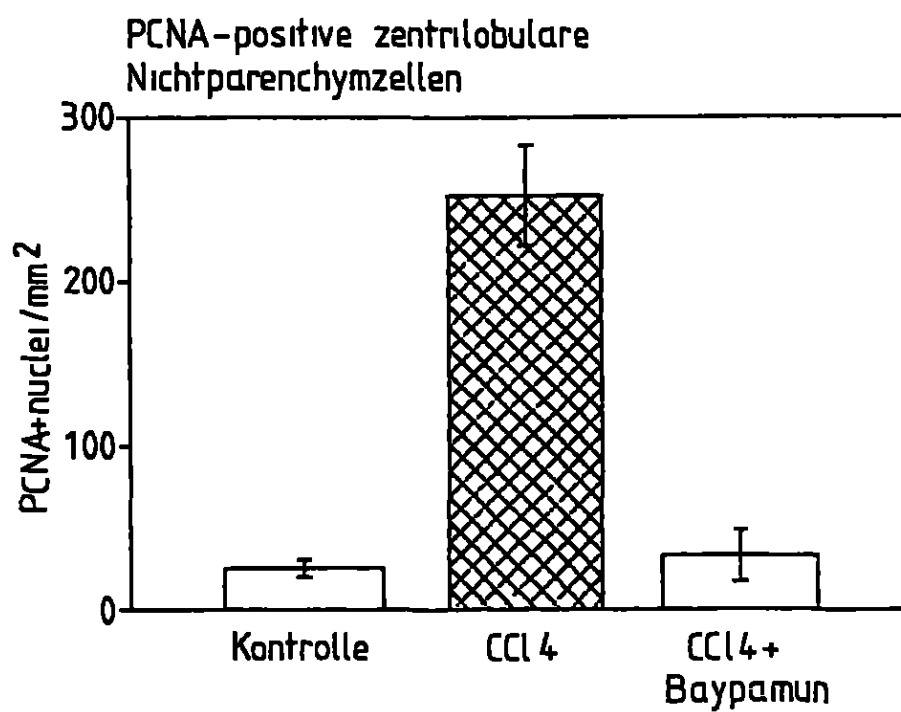
Effekt von PPVO D1701 (Baypamun®) auf die CCl₄-induzierte Leberfibrose Dosis 5×10^6 TCID₅₀/Tier

Tierzahlen n=6 gesunde Kontrollen, n=12 CCl₄-Kontrollen, n=13 CCl₄+ D1701

* $p < 0,02$ ** $p < 0,01$ (Kolmogorow-Smirnow-Test) versus CCl₄

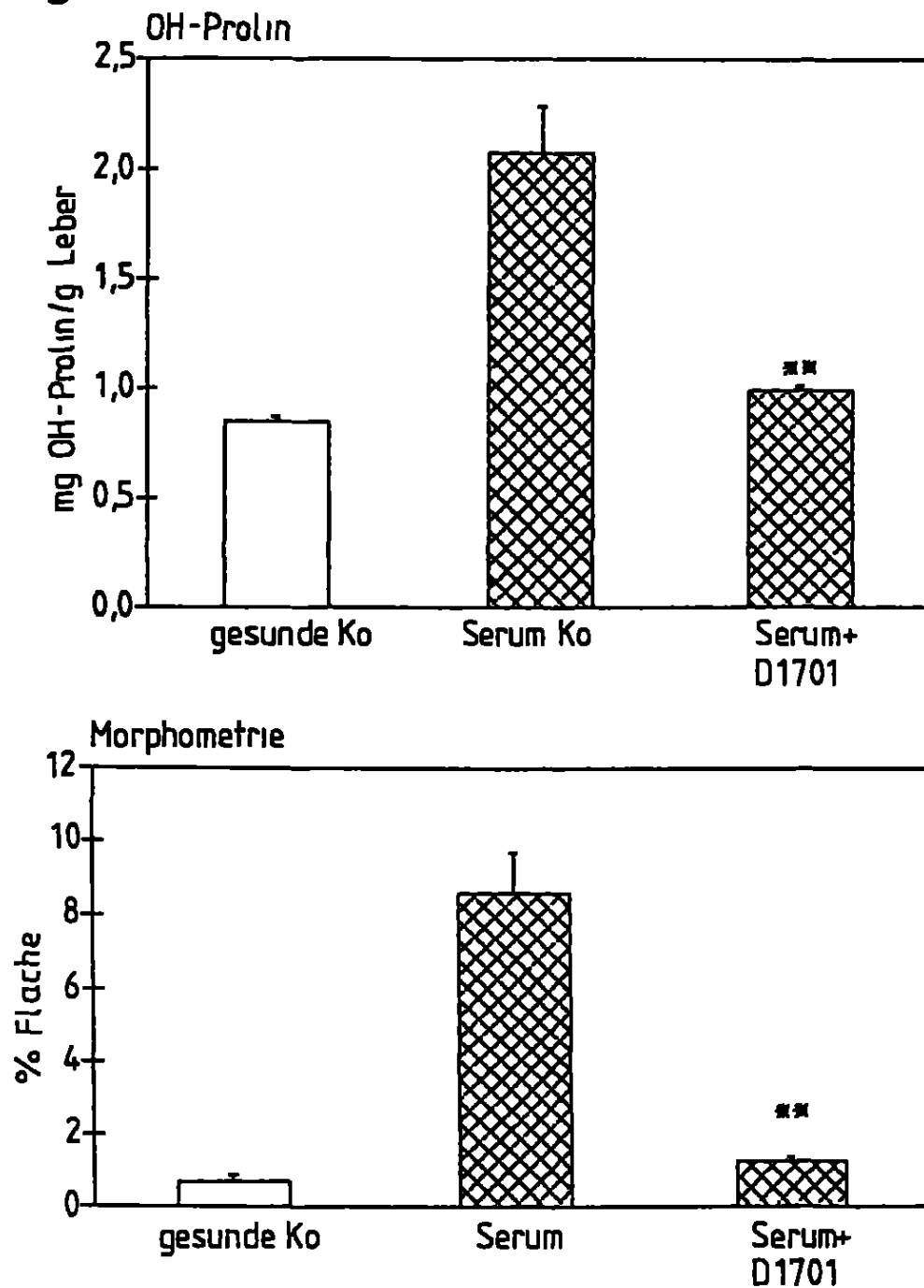
Fig 2

- 2 / 4 -

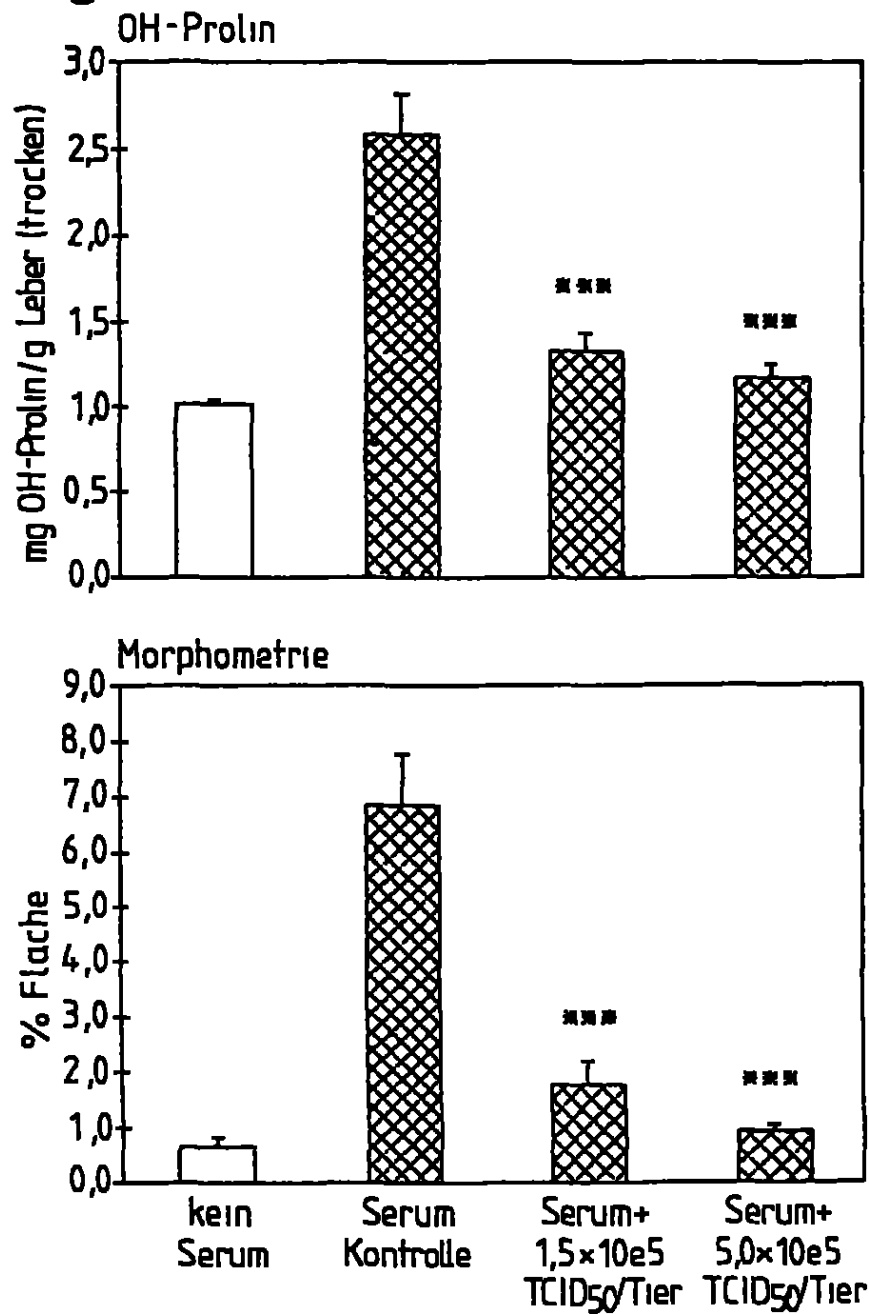
**Fig 3**

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 3 / 4 -

Fig 4

Effekt von PPVO D1701 (Baypamun®) auf die Schweineserum-induzierte Leberfibrose Dosis 5×10^6 TCID₅₀/Tier
Tierzahlen n=15 pro Serum-Gruppe, n=5 gesunde Kontrollen
***p<0.01 (Kolmogorow-Smirnow-Test) versus Serum Ko

Fig 5

Effekt von PPVO NZ2 auf die Schweineserum-induzierte Leberfibrose

Tierzahlen n=15 pro Serum-Gruppe, n=5 gesunde Kontrollen

*** $p < 0.01$ (Kolmogorow-Smirnow-Test) versus Serum Kontrolle

Use of strains of Parapoxvirus ovis against organ fibroses

- 5 The present invention relates to the use in humans of inactivated parapoxviruses in the prophylaxis and treatment of diseases which are accompanied by increased deposition of collagen, in connection with which both internal organs, such as liver, and the skin and its appended structures can be affected. The invention relates, in particular, to liver fibrosis and liver cirrhosis following viral hepatitis, or ethanol-induced liver diseases, and also cystic fibrosis
- 10 The present invention relates, in particular, to the use in humans of isolates of Parapoxvirus ovis, for example the strains D1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, New Zealand (NZ) isolates, e g NZ2, NZ7 and NZ10, and also Baypamun®, which is derived from D1701
- 15 In addition to the starting strains, the invention also relates to the descendants which are obtained by passaging and/or adaptation to particular cells, for example WI 38 In addition to the complete viruses, the invention also relates to parts or fragments of these viruses. Parts are to be understood as being genomic or subgenomic fragments which are expressed using suitable vectors for example vaccinia, in suitable systems
- 20 such as fibroblast cell cultures. Fragments are understood as being the fractions which are obtained by biochemical purification, such as chromatography, or the particles which are obtained after using physical methods, such as disruption by means of sonication
- 25 It is known that Parapoxvirus can stimulate the nonspecific immune reaction in vertebrates. Baypamun®, which is a preparation of chemically inactivated Parapoxvirus ovis, strain D1701, is used for the prophylaxis, metaphylaxis and therapy of infectious diseases and for preventing stress-induced diseases in animals
- 30 While the patent DE 3 504 940 A (Mayr, Anton) teaches the favourable effect of Baypamun® in conditions such as immunodeficiency induced by energy-rich

irradiation, chemotherapy, AIDS, immunosuppression, age-associated damage and detoxifying effects, it does not teach the immediate reduction of liver fibrosis. DE 3 504 940 also teaches that Baypamun® supports the efficacy of a tumour therapy as an adjunct and that it protects newborn children from diseases caused by inadequate maternal immune defence.

Taking the present state of knowledge as the starting point, it has now been found, surprisingly, that administration of inactivated parapoxviruses can reduce or prevent liver fibrosis. In animal models, this effect has been found in the case of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis, which is based on toxic liver damage, and in the case of liver fibrosis which is induced by heterologous serum and in which there is no liver inflammation. The extent of the therapeutic effect is also surprising: the excessive production of collagen which is associated with liver fibrosis is inhibited by 60% in the carbon tetrachloride model, while it is almost completely inhibited in the serum model. In agreement with these results from long-term experiments, it was then possible to demonstrate, from acute administration of carbon tetrachloride, that Baypamun® and the preparation obtained from the abovementioned Parapoxvirus ovis strains inhibit the transformation of the hepatic stellate cells into the collagen-producing myofibroblast type.

While liver fibrosis and/or liver cirrhosis can be induced by different noxas, such as viral infections and alcohol abuse, the different pathomechanisms enter a common final path, i.e. collagen production. As the animal experiment results from the above-described non-infectious models demonstrate, the administration of inactivated parapox viruses surprisingly prevents collagen deposition independently of the inducing noxa.

Parapoxviruses therefore open up a novel therapeutic principle for exerting an effect on the final path which is common to all the diseases leading to fibrosis.

This effect suggests that, when parapoxvirus preparations are used, a particularly effective therapy will be achieved even in the case of virus-induced liver fibrosis.

since it is known that such preparations possess additional immunostimulatory effects

5 The powerful antifibrotic effect of Baypamun® which has now been found opens up the possibility of employing Baypamun® or preparations of NZ2 as the reference standard for assessing antifibrotic effects in assays for identifying antifibrotic substances

10 Inactivated parapoxviruses or their descendants, and preparations obtained from the above strains, consequently possess an all-embracing antifibrotic spectrum of activity and are therefore suitable not only for the prophylaxis and therapy of fibrotic diseases of the liver but also in connection with fibrotic diseases of other organs, for example of the lungs, the pancreas, the heart and the skin Particular preference is given to using isolates of parapoxviruses in the prophylaxis and treatment of liver fibrosis and
15 liver cirrhosis

Depending on the clinical problem, the parapoxvirus-based therapeutic agent is administered systemically, that is, for example, intramuscularly, subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, orally or by inhalation, or else locally The
20 parapoxvirus is then present purified and lyophilized, and is suspended in a suitable solvent immediately prior to administration, or is present in another suitable formulation, or is present in a gastric juice-resistant oral administration form or some other oral administration form

25 In this connection, several administrations, or long-term treatment in accordance with chronological schemes which correspond to the requirements of the clinical problem, may be necessary

30 The present invention relates to the use of isolates of parapoxviruses, which are obtained from the strains D1701, orf-11, Greek orf strain 176, Greek orf strain 155 and the New Zealand (NZ) strains, for producing medicaments which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans Preference is given to

using New Zealand (NZ) strains, i.e. the strains NZ2, NZ7 and NZ10, for producing medicaments which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans, with the strain NZ2 being particularly preferred. In addition to this, the above-described parapoxviruses can be modified by passaging or adaptation to suitable cells, and those parapoxviruses which have been obtained by passaging or adaptation can be used for producing medicaments which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans, in connection with which it is possible to use human cells, such as WI-38, MRC-5, bovine cells, such as BK-K13A47/Reg or MDBK, and ovine cells, such as MDOK, for example, for the passaging or adaptation. It is also possible to use parts or fragments of the abovementioned parapoxviruses for producing medicaments which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans. Parts are understood as being genomic or subgenomic fragments which are expressed in suitable systems, such as fibroblast cell cultures, using suitable vectors, such as vaccinia viruses, and fragments are understood as being the fractions, which are obtained by biochemical purification, such as chromatography, of the viral particles which are expressed or which are physically disrupted, for example by the influence of ultrasonication. The invention furthermore relates to the use of the above-described parapoxvirus ovis strains, or of the modifications which are obtained therefrom as described above, in combination with other agents for producing medicaments and medicament preparations which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans, and to the use of Baypamun®, on its own or in combination with other agents for producing medicaments and medicament preparations which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans. The invention preferably relates to the use of the above-described Parapoxvirus ovis strains, or of the modifications which are obtained therefrom as described above, in combination with other agents in a formulation for oral administration, for example in gastric juice-resistant capsules.

The invention furthermore relates to the use of Baypamun® or preparations of NZ2 as a reference for assessing antifibrotic effects in assays for identifying antifibrotic substances.

Example 1Effect of Parapoxvirus ovis, strain D 1701, Baypamun®5 Methodology

Baypamun®, dry substance, a preparation isolated from chemically inactivated Parapoxvirus ovis, strain D 1701, was dissolved in water for injection as directed (titer based on the TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) approx 10⁷ per ml)

10 A Polygeline solution, having the same content of protein as in the Baypamun® solution, was administered to the control group animals as a placebo solution

0.5 ml of solution was administered i.p. per animal and administration. The administration was performed three times per week but never on consecutive days

15 Baypamun® was tested in two animal models in which the origin of the fibrosis differed, i.e. in the carbon tetrachloride model and in the pig serum model

20 Chronic treatment with carbon tetrachloride is a standard method for experimentally inducing liver fibrosis with subsequent cirrhosis (McLean EK, McLean AEM, Sutton PM. Instant cirrhosis. Br J Exp Pathol 1969, 50: 502-506). It is recognised generally as being a model for human liver fibrosis and liver cirrhosis. Female Sprague-Dawley rats were used. In order to ensure maximal induction of the microsomal metabolism of carbon tetrachloride, the animals were given 1 g of isoniazide/l with the drinking water one week before the beginning of the treatment.

25 Carbon tetrachloride was given orally every fifth day at a dose of 0.1 ml/100 g of body weight (carbon tetrachloride : mineral oil = 1 : 1). After seven weeks of treatment, the animals were sacrificed and examined. The treatment with Baypamun® was carried out in parallel with the carbon tetrachloride treatment.

30 Treatment with heterologous serum, for example pig serum in the case of rats, is likewise a method which is frequently employed in the literature for inducing liver

fibrosis with subsequent cirrhosis, with this method, in contrast to other models, only causing minimal damage to, and inflammation of, the liver parenchymal cells (Bhunchet, E. and Wake, K (1992) Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis Hepatology 16 1452-1473) Female Sprague
5 Dawley rats were treated 2 x weekly i.e. with 0.5 ml of sterile pig serum (Sigma)/animal, with the control animals being given sterile physiological sodium chloride solution (2 x weekly, 0.5 ml/animal i.p.) The treatment with Baypamun® was carried out in parallel with the pig serum treatment but never on the same day. After seven weeks of treatment, the animals were sacrificed and the livers were
10 removed for quantifying the content of collagen.

For examining the liver tissue histologically, standardized transverse tissue cylinders (approximately 10 x 2 mm) were punched out from the right anterior lobe of the liver. Frozen sections were stained with 0.1% Picrosinus red solution for detecting
15 scar collagen produced by the liver fibrosis.

Fast Green was used as a counterstain for contrast amplification. The extent of the liver fibrosis was determined in each section as the percentage fraction of the total area measured represented by the Picrosinus red-stained area. The parameters of the
20 videomicroscopic colour detection were standardized and kept constant throughout the experiment. 64 squares in a standardized 31 mm² grid were measured at 50-fold final magnification.

In order to quantify the extent of the transformation of hepatic stellate cells (HSC, also Ito cells or vitamin A storage cells) following acute treatment of rats with carbon tetrachloride, the α -smooth muscle actin-positive cells were detected
25 immunohistochemically. The α -smooth muscle actin-positive area was ascertained, at 200-fold final magnification, in each section in each case in 16 centrilobular 248 x 180 μ m fields. The transformation of HSC into collagen-producing and growth
30 factor-producing myofibroblast-like cells is known to be the crucial step in the induction of liver fibrosis. Transformed HSC are therefore an early indicator of fibrogenic activity in the liver.

A Leica Quantimed 500MC (Leica Germany) was used for the semiautomatic morphometry

5 In order to determine OH-proline, 50-100 mg of liver tissue were in each case dried and boiled for approx 17 hours with 6N HCl. After evaporating off the acid in a vacuum-drying oven, the residue was dissolved in 5 ml of distilled water and this solution was filtered. 200 μ l of the filtered solution were incubated, at room temperature for 25 min, with 200 μ l of ethanol and 200 μ l of oxidation solution (7% aqueous chloramine T hydrate solution, diluted 1:4 with acetate-citrate buffer
10 pH 6.0). After that, 400 μ l of Ehrlich's reagent (12 g of 4-dimethylaminobenzaldehyde in 20 ml of ethanol + 2.74 ml of concentrated sulphuric acid in 20 ml of ethanol) were added. After incubation at 35°C for 3 hours, the absorption was measured at 573 nm. Aqueous OH-proline (Sigma) solutions were used for the standard series. The content of OH-proline in the liver samples was
15 calculated in mg per g of liver dry weight.

In order to monitor the formation of reactive oxygen free radicals, the concentration of reduced α -tocopherol (α -TOC) a free radical-capturing agent was measured in the liver, while the activity of the free radical-sensitive enzyme 7-ethoxyresorufin
20 deethylase (EROD) was measured in the serum. Both parameters are characteristically down-regulated in association with carbon tetrachloride poisoning and enable the severity of the oxidative damage to the tissue to be estimated.

The liver status of the animals was determined by measuring some standard serum
25 parameters: alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (AP), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyl transferase (GGT), glutamate dehydrogenase (GLDH), and total bilirubin (TBIL).

Results.

Treatment with Baypamun® significantly decreases the extent of the fibrotic degeneration of the livers of carbon tetrachloride-treated rats (Fig 1) In addition, an almost complete inhibition of the HSC transformation can be observed (Fig 2) The number of proliferating non-parenchymal cells in the livers of Baypamun®-treated animals is markedly reduced (Fig 3) Non-parenchymal cells include HSC and the Kupffer cells which are likewise involved in the fibrogenesis

The serum indicators of hepatocellular damage, such as ALT, AP, AST, GGT, GLDH and TBIL (Table 1), show a tendency to normalization

The same decrease in EROD and α -tocopherol concentrations in the control group and in the Baypamun®-treated group provides evidence of the presence of toxic reactive oxygen free radicals resulting from the carbon tetrachloride poisoning in both groups (Tables 1 and 2) The possibility of the 'antifibrotic' effect of Baypamun® being due to a detoxification effect can therefore be ruled out

In the serum model, Baypamun® exhibits almost complete suppression of the fibrosis (Fig 4) In the Baypamun®-treated rats, both the content of hydroxyproline and the sirius red-stainable area in the livers are virtually at levels seen in the healthy control animals, whereas they are increased severalfold in the serum-treated control rats In the Baypamun group, the increase in collagen content which is induced by the pig serum treatment is only 10% of the corresponding value in the control group

Example 2**Parapoxvirus ovis, strain NZ 2****5 Methodology**

NZ2 virus was replicated in tank stacks. For this, BK clone 3A cells were cultured for 3 to 5 days in cell culture dishes (37°C) in EMEM 2 gr + 10% FCS until the cell lawn was 90 to 100% confluent. Four cell culture dishes were used as inoculum for
10 each tank stack and the latter was filled with medium (EMEM 2 gr + 10% FCS) to a volume of 2.5 litres. After incubating at 37°C for from 3 to 5 days (90 to 100% confluent cell lawn), the medium was replaced with EMEM 2 g without added serum and the culture was infected with NZ2 virus (MOI, 0.001 to 0.01).

15 After 100% CPE had been reached (incubation at 37°C for approx. 7 to 8 days), the virus was harvested. For this, the virus suspension was aliquoted into sterile media bags and frozen at -80°C. The suspension was subsequently thawed at 37°C in an incubation room and freed of cells by means of deep-bed filtration (pore size 5 µm). After this, the virus suspension was concentrated by a factor of 20 to 40 by means of
20 ultrafiltration (100 kDa cutoff). As an alternative, the virus can be concentrated by ultracentrifugation (Ti45, 30,000 rpm, 4°C, 60 min).

The titre, as achieved by the concentration, of the virus present in the suspension was determined by means of titrating on BK clone 3A cells. After the virus titre had been
25 adjusted to 6.0 using EMEM medium without FCS, the virus was then heat-inactivated at 58°C for 2 h. The inactivation was checked by means of an inactivation control performed on BK clone 3A cells.

Parapoxvirus ovis, strain NZ2 was investigated in the model, already used in
30 Example 1, of pig serum-induced liver fibrosis in rats.

40

Female Sprague Dawley rats were treated i p 2 x weekly with 0.5 ml of sterile pig serum (Sigma)/animal, while control animals were treated with sterile physiological sodium chloride solution (2 x weekly, 0.5 ml/animal i p). Strain NZ 2 was administered i p 3 x weekly in doses of 1.5×10^5 and 5.0×10^5 TCID₅₀/animal, respectively (administration volume 0.5 ml/animal). For the lower dose, the starting material was diluted with cell culture medium (Eagle's minimum essential medium, Sigma). Control animals were treated with cell culture medium. While the treatment with strain NZ 2 took place in parallel with the serum treatment, it was never given on the same day. After 7 weeks of treatment, the animals were killed and the livers were removed, the liver fibrosis was then quantified both morphometrically and by way of the content of OH-proline. The methodology for this has already been described in Example 1.

Results

The results of the collagen determination are depicted in Fig. 5. Surprisingly, the treatment with strain NZ 2 is able to suppress the development of liver fibrosis. In comparison with healthy animals, the serum-treated control animals exhibit a marked increase in the content of OH-proline and in sirius red-stainable collagen. This increase is reduced by NZ 2 in a dose-dependent manner. The extent of the effect is also surprising: the 5×10^5 TCID₅₀ dose reduces the increase in the content of collagen in the liver to less than 10% of the control value. A qualitative assessment of the histological preparations showed that the proportion of animals having collagen septa is reduced from 93% (14/15) down to 33% (5/15) in the 1.5×10^5 TCID₅₀ group and down to 0% in the 5.0×10^5 TCID₅₀ group.

Example 3**Antifibrotic effect of PPVO following oral administration**

- 5 PPVO was formulated as a dry lyophilisate in gastric juice-resistant capsules (Elanco, Indianapolis, USA)

Four groups of in each case six experimental animals were treated as follows. One control group (group 1) was given only a gastric juice-resistant capsule (without
10 PPVO), which was administered orally, with sterile sodium chloride solution (0.5 ml/animal) being additionally injected i.p. In group 2, a gastric juice-resistant capsule (without PPVO) was administered orally together with 0.5 ml of carbon tetrachloride/animal, with 0.5 ml of physiological sodium chloride solution being injected i.p. Animals in group 3 were again given, by oral administration, a gastric
15 juice-resistant capsule (without PPVO) together with 0.5 ml of carbon tetrachloride/animal. In addition, the animals of group 3 were given PPVO D1701 (dose 5×10^6 TCID₅₀/animal) in 0.5 ml of water for injection, with this being injected i.p. Group 4 were given, by oral administration, PPVO D1701 (dose 5×10^6 TCID₅₀/animal, formulated in a gastric juice-resistant capsule) together with 0.5 ml of carbon
20 tetrachloride. The animals in group 4 were also given 0.5 ml of sterile sodium chloride solution, which was injected i.p.

After 48 hours, the livers were removed and the α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive centrilobular area was determined histochemically, for each animal, as a
25 percentage of the total area measured in representative tissue sections (Johnson S J, Hines JE, Burt AD. Phenotypic modulation of perisinusoidal cells following acute liver injury: a quantitative analysis. Int J Exp Path 1992, 73: 765-772). This value is a measure of the transformation of the liver stellate cells.

- 30 Two experimental series were carried out in accordance with the above description. The experimental results of the first experimental series are reproduced in Table 3 while the results of the 2nd experimental series are reproduced in Table 4.

In experimental series 1, the proportion of the α -SMA-positive centrilobular area in the liver tissue of animals which were given PPVO D1701 by i.p. administration (group 3) was inexplicably (and contrary to the remainder of the experimental experience) higher than in animals which did not receive any PPVO. For this reason,
5 experimental series 2 was carried out as a repeat experiment

In both experimental series, an approx. 50% inhibition of transformation, as compared with the control group (in each case group 2), was observed, in a concordant and surprising manner, following oral administration of PPVO D1701 (in
10 each case group 4). In the 2nd experimental series, the inhibition of transformation following oral administration of PPVO D1701 (group 4) is of a similar magnitude to that observed when PPVO D1701 is administered peritoneally (group 3)

It can be deduced from these results that PPVO also displays its antifibrotic effect
15 following oral administration

Table 1

Influence of Baypamun® on serum parameters of liver status and indicators of an intoxication							
	ALT	AST	AP	GGT	GLDH	TBIL	EROD
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	µmol/l	nmol g x min
Control	49.1	45.7	162.8	0.8	12.5	1.6	0.30
SEM	3.7	8.7	14.76	0.2	7.9	0.2	0.02
Carbon tetrachloride	95.6	92.4	392.7	6.1	37.1	2.9	0.15
SEM	14.7	14.1	43.0	1.3	14.8	0.3	0.01
Ct+ Baypamun®	72.0	65.9	329.5	4.5	18.2	1.9	0.17
SEM	9.9	9.1	26.9	0.8	4.0	0.2	0.03

ALT	alanine aminotransferase	GLDH	glutamate dehydrogenase
AST	aspartate aminotransferase	TBIL	total bilirubin
AP	alkaline phosphatase	EROD	7-ethoxvresorufin deethylase
GGT	γ-glutamyl transferase		

44

Table 2

Influence of Baypamun®	
on liver α-tocopherol	
	<i>α-Tocopherol</i> nmol / g of tissue
<i>Control</i>	73 1
<i>SEM</i>	2 2
<i>Carbon tetrachloride</i>	35 7
<i>SEM</i>	2 3
<i>Ct + Baypamun®</i>	38 5
<i>SEM</i>	6 1

VJ

Table 3

5 Influence of PPVO, following intraperitoneal or oral administration, on the transformation of liver stellate cells following the administration of a fibrogenic dose of carbon tetrachloride (Experimental series 1)

Fibrosis	Administration	DOSE	α -SMA (%)
Group 1 Intact	empty capsule orally + water for injection 1 p	—	0.28 ± 0.04
Group 2 Carbon tetrachloride	empty capsule orally + water for injection 1 p	—	2.76 ± 0.79
Group 3 Carbon tetrachloride	PPVO in water for injection 1 p + empty capsule orally	5×10^6 TCID ₅₀ / animal	5.05 ± 2.00
Group 4 Carbon tetrachloride	PPVO in capsule, orally + water for injection 1 p	5×10^6 TCID ₅₀ / animal	1.46 ± 0.34

Table 4

Influence of PPVO, following intrapentoneal or oral administration, on the transformation of liver stellate cells following administration of a fibrogenic dose of carbon tetrachloride (experimental series 2)

Fibrosis	Administration	DOSE	α -SMA (%)
Intact Group 1	empty capsule orally + water for injection i p	---	0.20 ± 0.04
Carbon tetrachloride Group 2	empty capsule orally + water for injection i p	---	3.18 ± 0.56
Carbon tetrachloride Group 3	PPVO in water for injection i p + empty capsule orally	5×10^6 TCID ₅₀ /animal	1.22 ± 0.35
Carbon tetrachloride Group 4	PPVO in capsule orally + water for injection i p	5×10^6 TCID ₅₀ /animal	1.55 ± 0.34

Patent Claims

- 1 Use of isolates of parapoxviruses for producing medicaments which have a
preventive or curative effect on organ fibroses in humans
- 5
- 2 Use of isolates of parapoxviruses, for example of the strains D 1701, orf-11,
Greek orf strain 176, Greek orf strain 155, and the New Zealand (NZ) strains,
for producing medicaments which have a preventive or curative effect on
organ fibroses in humans
- 10
- 3 Use of isolates of parapoxviruses according to Claims 1-2, characterized in
that the New Zealand (NZ) strains which are used for producing medicaments
which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans are the
strains NZ2, NZ7 and NZ10
- 15
- 4 Use of parapoxviruses according to Claims 1-3, which parapoxviruses have
been modified by passaging or adaptation to suitable cells, for producing
medicaments which have a preventive or curative effect on organic fibroses in
humans
- 20
- 5 Use of parapoxviruses according to Claims 1-3, which parapoxviruses have
been modified by passaging or adaptation to suitable cells, for producing
medicaments which have a preventive or curative effect on organ fibroses in
humans, characterized in that human cells, such as WI-38 or MRC-5, bovine
25 cells, such as BK-K13A47/Reg or MDBK, and ovine cells, such as MDOK,
are used for the passaging or adaptation
- 30
- 6 Use of parts or fragments of the viruses according to Claims 1-5 for
producing medicaments which have a preventive or curative effect on organ
fibroses in humans, characterized in that parts are to be understood as being
genomic or subgenomic fragments which are expressed with the aid of
suitable vectors such as vaccinia viruses, in suitable systems, such as

fibroblast cell cultures, and fragments are to be understood as being the fractions which are obtained by means of biochemical purification, such as chromatography, of the expressed or physically disrupted viral particles

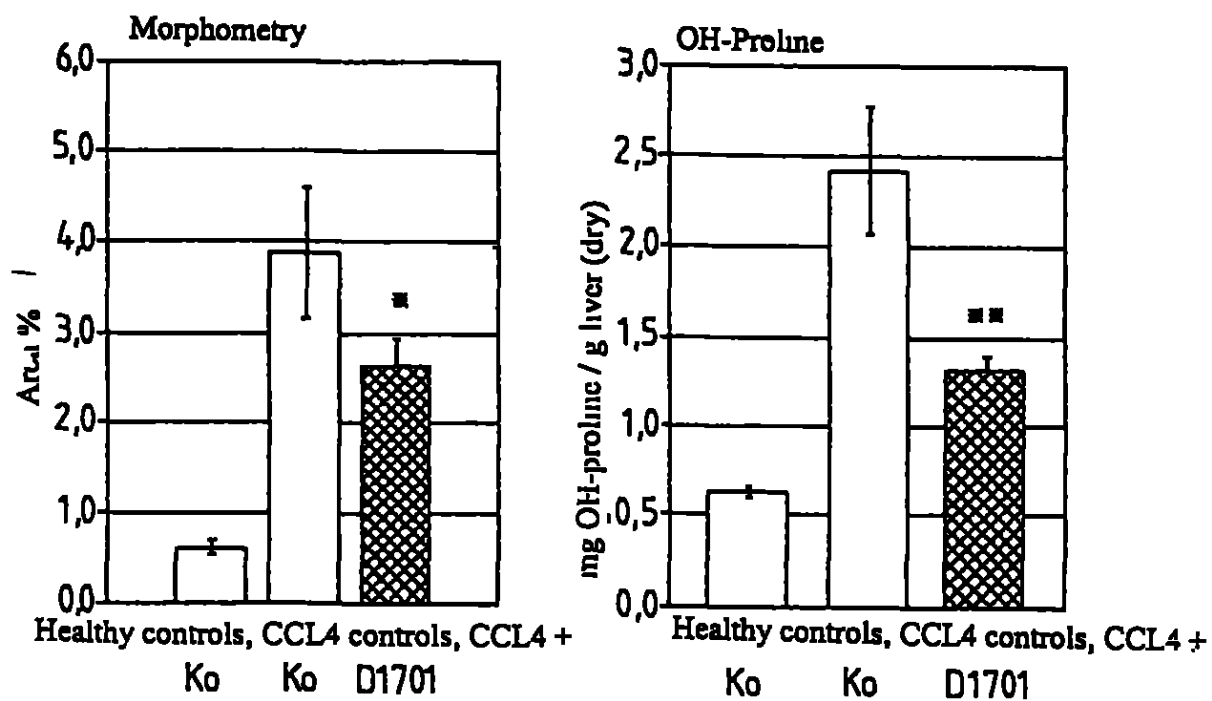
- 5 7 Use of one of the isolates according to Claims 1-6 in combination with other remedies for producing medicaments and pharmaceutical preparations which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans
- 10 8 Use of Parapox ovis D 1701, on its own or in combination with other remedies, for producing medicaments and pharmaceutical preparations which have a preventive or curative effect on organ fibroses in humans
- 15 9 Use of Parapox ovis D 1701, or preparations of NZ2, as a reference standard for assessing antifibrotic effects in assays for identifying antifibrotic substances
- 20 10 Use of Parapox ovis D 1701 according to Claim 8, characterized in that the pharmaceutical preparations and medicaments are suitable for oral administration

Use of strains of Parapoxvirus ovis against organ fibroses

A b s t r a c t

The present invention relates to the use, in humans, of inactivated parapoxviruses for the prophylaxis and treatment of diseases which are accompanied by an increased deposition of collagen, with it being possible for both internal organs, such as the liver, and the skin and its appended structures, to be affected. The invention relates, in particular, to liver fibrosis and/or liver cirrhosis consequent upon virus hepatitis, or to ethanol-induced liver diseases and to cystic fibrosis.

Fig 1



Effect of PPVO D1701 (Baypamun®) on CCl₄-induced liver fibrosis Dose 5×10^6 TCID₅₀/animal

Number of animals n = 6 healthy controls, n = 12 CCL₄ controls, n = 13 CCL₄ + D1701

* p < 0.02, ** p < 0.01 (Kolmogorow-Smirnow test) versus CCl₄

Fig 2

- 2 / 4 -

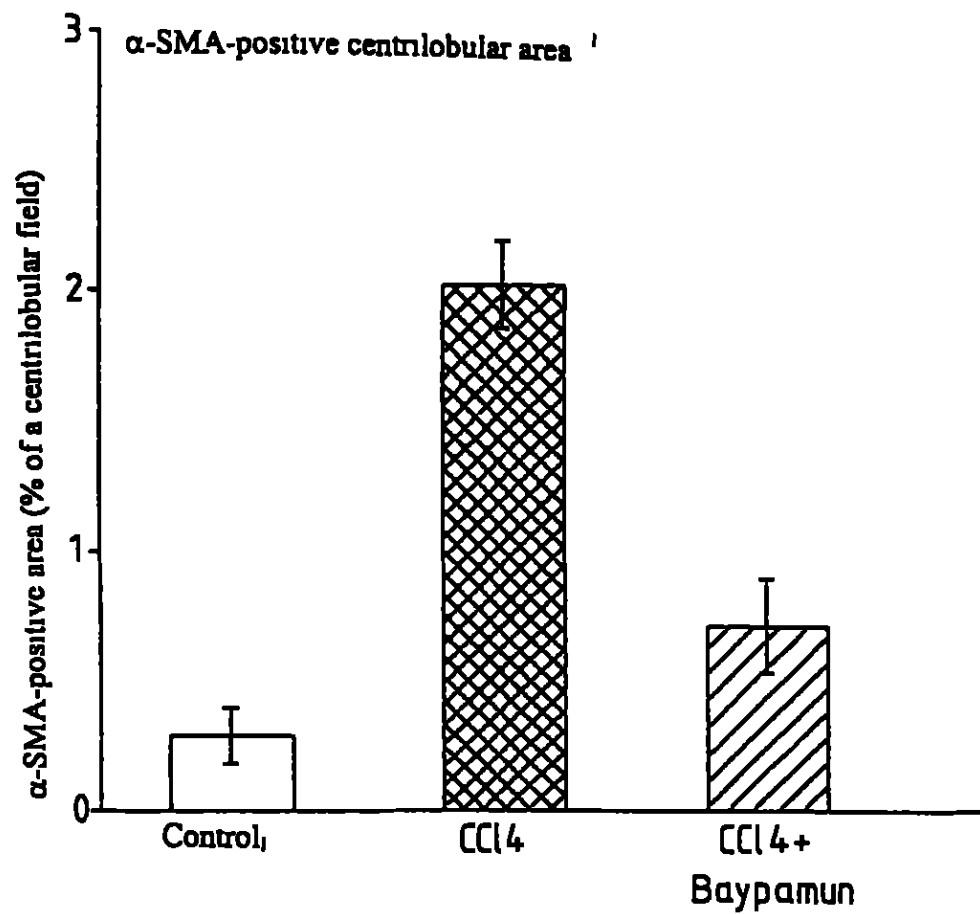
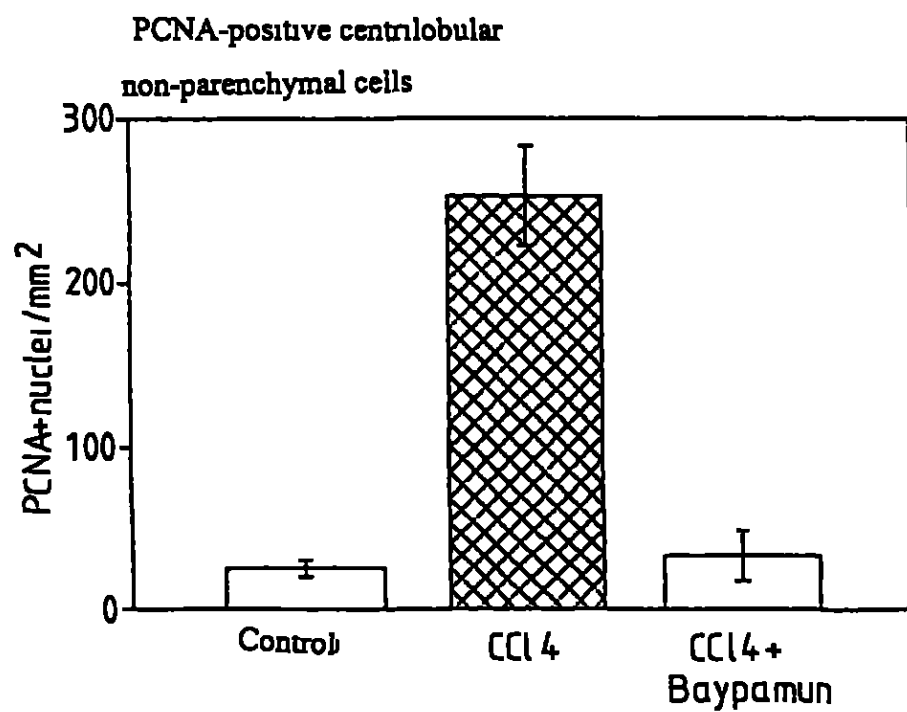
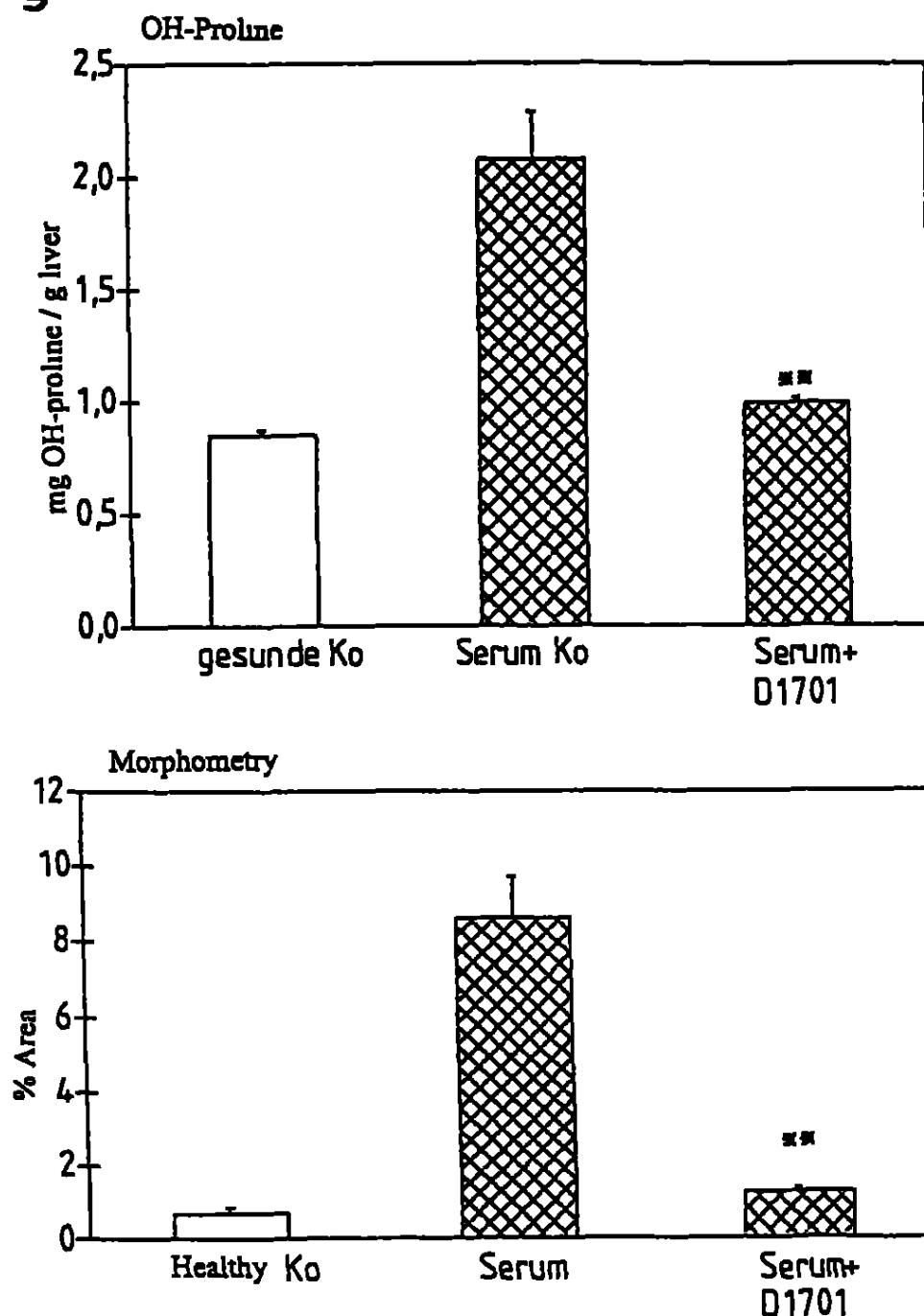
**Fig 3**

Fig 4

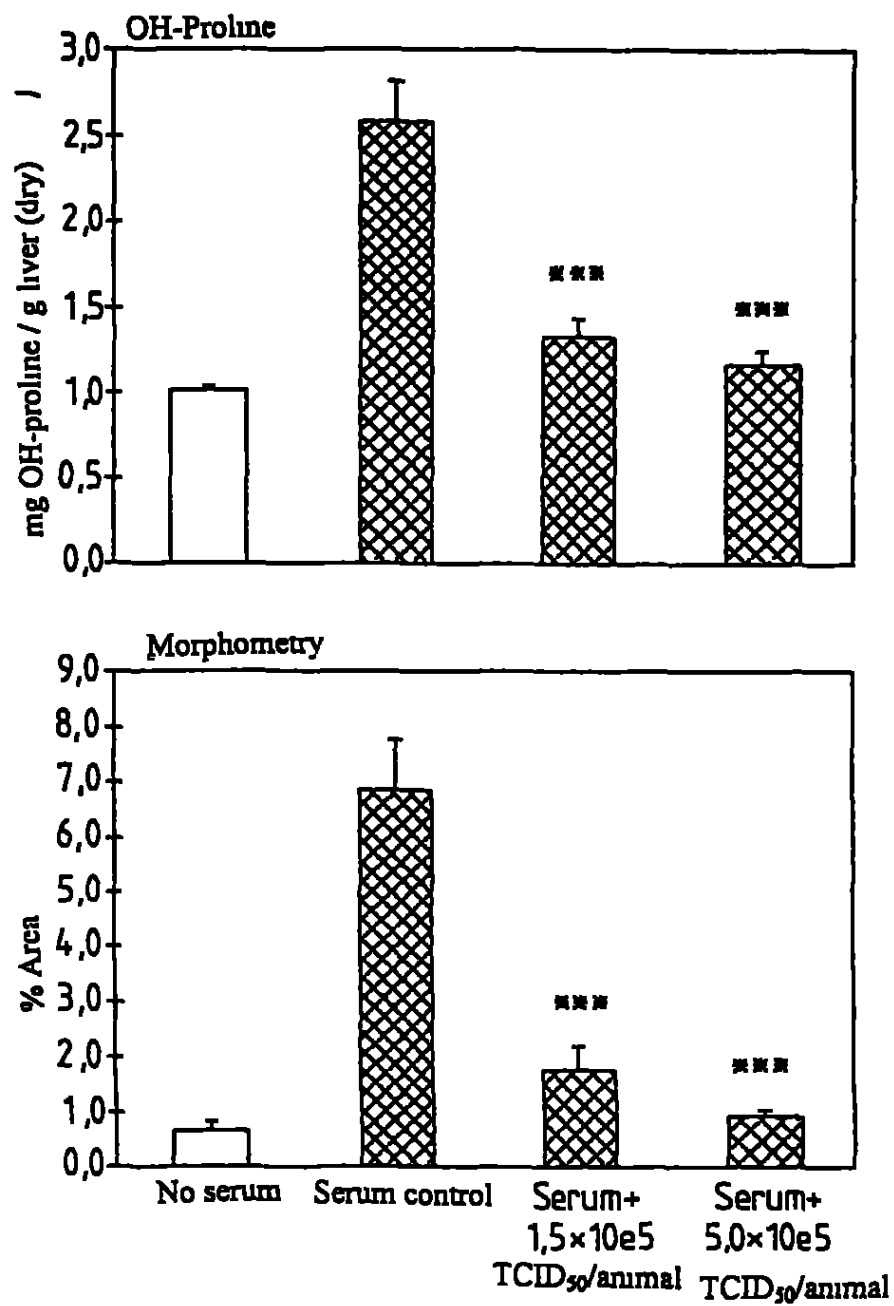


Effect of PPVO D1701 (Baypamun®) on porcine serum-induced liver fibrosis Dose 5×10^6 TCID₅₀/animal

Numbers of animals n = 15 per serum group, n = 5 healthy controls

** p<0.01 (Kolmogorov-Smirnov test) versus serum controls

Fig 5



Effect of PPVO NZ2 on porcine serum-induced liver fibrosis
Numbers of animals n = 15 per serum group, n = 5 healthy controls
*** p<0.01 (Kolmogorov-Smirnov test) versus serum controls

PCT

INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LEA34714-WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/16)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/ 07978	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/07/2001	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/07/2000
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/12		
Anmelder BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, et al		

1 Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt. 2 Dieser BERICHT umfaßt insgesamt <u>2</u> Blätter einschließlich dieses Deckblatts ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei, dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70 16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften zum PCT) Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter
3 Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten I ☒ Grundlage des Berichts II ☐ Priorität III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit. Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23/01/2002	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 24/06/2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel (+49-89) 2399-0 Tx 523656 epmu d Fax (+49-89) 2399-665	Bevollmächtigter Bediensteter LONATI M Tel (+49-89) 2399 2828

Formblatt PCT/IPEA/09 (Deckblatt) (Juli 1998)



5-5

I Grundlage des Berichts

Grundlage dieses Berichtes sind die Anmeldungsunterlagen in der ursprünglich eingereichten Fassung

III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Die Frage, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderscher Tätigkeit beruhend und gewerblich anwendbar anzusehen ist, war nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung für die nicht recherchierten Ansprüche (Artikel 17(2)(a) oder (3) und Regel 66 1(e) PCT, siehe auch internationaler Recherchenbericht)

V Begründete Feststellung nach Regel 66 2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit

Soweit die internationaler vorläufige Prüfung durchgeführt wurde (s Punkt III oben), ist folgendes anzumerken

In Anbetracht der im internationalen Recherchenbericht angeführten Unterlagen wird festgestellt, daß die Erfindung, wie sie in mindestens einigen von den Ansprüchen gekennzeichnet ist die in Artikel 33(1) PCT aufgeführten Kriterien allem Anschein nach nicht erfüllt, d h nicht als neu und/oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend anzusehen ist (siehe internationaler Recherchenbericht, insbesondere die mit X und/oder Y angeführten Unterlagen und die entsprechenden Anspruchsnummern)

translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

712

Applicant's or agent's file reference LEA34714-WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/EP01/07978	International filing date (day/month/year) 11 July 2001 (11 07 01)	Priority date (day/month/year) 11 July 2000 (11 07 00)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/12		
Applicant BAYER AKTIENGESELLSCHAFT		

1	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2	This REPORT consists of a total of <u>2</u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70 16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT) These annexes consist of a total of _____ sheets
3	This report contains indications relating to the following items I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☒ Non establishment of opinion with regard to novelty inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2002 (23 01 02)	Date of completion of this report 24 June 2002 (24 06 2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No	Authorized officer Telephone No

57

I Basis of the report

The basis of international preliminary examination report is the application as originally filed

III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66 1(e) PCT, see also international search report)

V Reasoned statement under Article 66 2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out.

In light of the documents cited in the international search report it is considered that the invention as defined in at least some of the claims, which have been the subject of an international search report, does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references)

JB

PCT-ANTRAG

LEA34714-WO

Original (für EINREICHUNG) gedruckt am 10 07 2001 01 21.22 PM

0	Vom Anmeldeamt auszufüllen	
0 1	Internationales Aktenzeichen	
0 2	Internationales Anmeldedatum	NEUANMELDUNG 17 Juli 2001
0-3	Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	

0-4	Formular PCT/RO/101 PCT-Antrag	
0-4 1	erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2 91 (aktualisiert 01 01 2001)
0 5	Antragsersuchen Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird	
0-6	(Vom Anmelder gewähltes) Anmeldeamt	Europäisches Patentamt (EPA) (RO/EP)
0 7	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34714-WO
I	Bezeichnung der Erfindung	VERWENDUNG VON STÄMMEN DES PARAPOXVIRUS OVIS GEGEN ORGANFIBROSEN
II	Anmelder	
II 1	Diese Person ist	nur Anmelder
II 2	Anmelder für	Alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US
II-4	Name	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
II 5	Anschrift	D-51368 Leverkusen Deutschland
II-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
II 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
II-8	Telefonnr	0214 30 71166
II 9	Telefaxnr	0214 30 53482
III 1	Anmelder und/oder Erfinder	
III 1 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 1 2	Anmelder für	Nur US
III 1-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	BIRTH-DIETRICH, Claudia
III 1 5	Anschrift	Stockmannsmühle 127 D-42115 Wuppertal Deutschland
III 1-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 1 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE

III 2	Anmelder und/oder Erfinder	
III 2 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 2 2	Anmelder für	Nur US
III-2-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	SCHLAPP, Tobias
III 2-5	Anschrift	Gerstenkamp 10 D-51061 Köln Deutschland
III-2-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-2 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III-3	Anmelder und/oder Erfinder	
III-3-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-3-2	Anmelder für	Nur US
III-3-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	SIEGLING, Angela
III-3-5	Anschrift	7, rue Francois Bonvin F-75015 Paris Frankreich
III 3-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 3 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	FR
III-4	Anmelder und/oder Erfinder	
III- 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III- 2	Anmelder für	Nur US
III-4-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	KNORR, Andreas
III-4 5	Anschrift	Trilliser Graben 10 D-40699 Erkrath Deutschland
III-4-8	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III- 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III-5	Anmelder und/oder Erfinder	
III 5 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 5-2	Anmelder für	Nur US
III 5-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	WEBER, Olaf
III 5-5	Anschrift	539 Amity Road Woodbridge, CT 06525 Ver St von Amerika
III-5 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 5-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	US
III-6	Anmelder und/oder Erfinder	
III-6-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-6-2	Anmelder für	Nur US
III-6-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	THEISS, Gudrun
III 6-5	Anschrift	Boeddinghausstr 13 D-42329 Wuppertal Deutschland
III-6-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 6-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE

IV 1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten und zwar als	gemeinsamer Vertreter
IV 1 1	Name	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
IV 1 2	Anschrift:	D-51368 Leverkusen Deutschland
IV 1-3	Telefonnr	0214 30 71166
IV 1-4	Telefaxnr	0214 30 53482
V	Bestimmung von Staaten	
V 1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-3	Nationales Patent (Staaten die dem PCT nach Veröffentlichung dieser PCT EASY Version beigetreten sind)	und alle weiteren Staaten, die am Anmeldetag dem PCT angehören

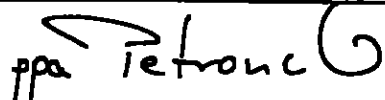
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 und V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.8 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.		
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE	
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht		
VI-1.1	Anmeldedatum	11 Juli 2000 (11.07.2000)	
VI-1.2	Aktenzeichen	10033581 0	
VI-1.3	Staat	DE	
VI-2	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht		
VI-2.1	Anmeldedatum	08 Mai 2001 (08.05.2001)	
VI-2.2	Aktenzeichen	10122233 5	
VI-2.3	Staat	DE	
VII-1	Gewählte internationale Recherchenbehörde	Europäisches Patentamt (EPA) (ISA/EP)	
VIII	Kontrollliste	Anzahl der Blätter	Elektronische Datei(en) beigelegt
VIII-1	Antrag	5	-
VIII-2	Beschreibung	17	-
VIII-3	Ansprüche	2	-
VIII-4	Zusammenfassung	1	EZABST00 TXT
VIII-5	Zeichnung(en)	5	-
VIII-7	INSGESAMT	30	
VIII-8	Beigelegte Unterlagen	Unterlage(n) in Papierform beigelegt	Elektronische Datei(en) beigelegt
VIII-8	Blatt für die Gebührenberechnung	✓	-
VIII-9	Gesonderte unterzeichnete Vollmacht		-
VIII-12	Prioritätsbeleg(e)	Unterlage(n) VI-1	-
VIII-14	Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen und/oder anderem biologischen Material	✓	-
VIII-16	PCT EASY Diskette	-	Diskette
VIII-18	Nr. der Abb. der Zeichn., die mit der Zusammenf. veröffentlicht werden soll	<Nr. >	
VIII-19	Sprache der int. Anmeldung	Deutsch	

62

PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) gedruckt am 10 07 2001 01 21.22 PM

LEA34714-WO

IX 1	Unterschrift des Anmelders oder Anwalts		
IX 1 1	Name	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT	

ppa Dr Petrovicki i V Dr Hollberg
VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

10-1	Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung	
10-2	Zeichnung(en)	
10-2 1	Eingegangen	
10-2-2	Nicht eingegangen	
10-3	Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingeg. Unterlage(n) oder Zeichnung(en) zur Vervollständigung dieser Int. Anmeldung	
10-4	Datum des fristgerechten Eingangs der Berichtigung nach PCT Artikel 11(2)	
10-5	Internationale Recherchenbehörde	ISA/EP
10 6	Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

11 1	Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro	
------	---	--

A



LeA 34714 63

LeA 34376

Centre for Applied Microbiology and Research
and
European Collection of Cell Cultures

This document certifies that
Virus PPVO NZ-2
Deposit Reference 01071006

has been accepted as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977,
with the European Collection of Cell Cultures on
10 July 2001



Dr D H Lewis
General Manager
ECACC

CAMR
Centre for Applied Microbiology and Research

European Collection of Cell Cultures, CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK.

Tel: 44 (0) 1980 612512 Fax: 44 (0) 1980 611315 Email: ecacc@camr.org.uk Web Site: ecacc.org.uk

64

Applicant's designation of the invention	LaA 34 376 WO	International application No	PCT/EP01/07991
---	---------------	------------------------------	----------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 6 line 15	
B IDENTIFICATION OF DEPOSIT	
Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution European Collection of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG United Kingdom	
Date of deposit July 10th 2001	Accession Number ECACC 01071006
C ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
This information is continued on an additional sheet ☐	
D DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designating States)	
E SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications and the accession number of Deposit)	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on
Authorized office	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1993)

Applicant's or agent's file reference	LeA 34 714-WO	International application No	PCT/EP01/07978
--	---------------	------------------------------	----------------

65

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>5</u> line <u>12</u>	
B IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution European Collection of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG United Kingdom	
Date of deposit July 10th 2001	Accession Number ECACC 01071006
C ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on
Authorized officer	Authorized officer

FORM PCT/EP 114 (01/1999)

GESAMT SEITEN 04

01/03/2003 11E 07 17 (= TV/RA 8048) 0004

USO DE CEPAS DE PARAPOXVIRUS OVIS FRENTE A FIBROSIS DE
ÓRGANOS

La presente invención se refiere al uso en seres humanos de
5 parapoxvirus inactivados en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades que
están acompañadas por una elevada deposición de colágeno, pudiendo estar
afectados tanto órganos internos, por ejemplo el hígado, como la piel y sus
anejos. Se refiere especialmente a fibrosis hepática o a cirrosis hepática como
consecuencia de hepatitis viral o a enfermedades hepáticas inducidas por el
10 etanol, así como a fibrosis quística.

La presente invención se refiere especialmente al uso en seres humanos
de aislados de *Parapoxvirus ovis*, por ejemplo de la cepa D1701, orf-11, cepa
175 orf griega, cepa 155 orf griega, aislados de Nueva Zelanda (NZ), por
ejemplo NZ2, NZ7 y NZ10, incluyendo el Baypamun® derivado de D1701.

15 Se refiere, además de a las cepas originales, también a la descendencia
obtenida mediante pases y/o adaptación en células determinadas, por ejemplo
WI 38. Se refiere, además de a los virus completos, también a partes o
fracciones de estos virus. Se entiende por partes los fragmentos genómicos o
subgenómicos expresados mediante vectores adecuados, por ejemplo virus
20 Vaccinia, en sistemas adecuados como cultivos celulares de fibroblastos. Se
entiende por fracciones las fracciones obtenidas mediante purificación
bioquímica como cromatografía o las partículas obtenidas tras el uso de
procedimientos físicos como disgregación con ultrasonidos.

Es conocido que los parapoxvirus pueden estimular la inmunoreacción
25 no específica de vertebrados. Baypamun®, una preparación de *Parapoxvirus*

ovis químicamente inactivado, cepa D1701, se utiliza para la profilaxis, metafilaxia y terapia de enfermedades infecciosas, así como para la prevención de enfermedades inducidas por el estrés en animales

La patente DE 3 504 940 A (Mayr, Anton) explica la actividad ventajosa de Baypamun® en estados como la inmunodeficiencia por irradiación energética, quimioterapia, SIDA, inmunosupresión, daños relacionados con la edad así como los efectos detoxificantes, pero no la reducción inmediata de una fibrosis hepática. El documento DE 3 504 940 explica además que Baypamun® potencia como coadyuvante la actividad de una terapia tumoral, y que protege a los recién nacidos de enfermedades provocadas por una insuficiente defensa inmune materna

A partir del estado presente de los conocimientos, se ha encontrado ahora sorprendentemente que la administración de parapoxvirus inactivados puede reducir o inhibir la fibrosis hepática. Esta actividad se encontró en modelos animales de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, que se basa en un daño hepático tóxico, y de fibrosis hepática inducida por suero de otra especie, que no conduce a una inflamación hepática. Es además sorprendente la extensión del efecto terapéutico. La producción de colágeno en exceso en la fibrosis hepática se inhibe en el modelo de tetracloruro de carbono un 60%, y en el modelo de suero casi totalmente. En conformidad con estos resultados en experimentos a largo plazo, podía mostrarse ahora que, después de la administración aguda de tetracloruro de carbono, Baypamun® y las preparaciones obtenidas de las cepas anteriormente citadas de *Parapoxvirus ovis* inhiben la transformación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos de tipo productor de colágeno

La fibrosis hepática o cirrosis hepática pueden estar provocadas por diferentes agentes nocivos, como por ejemplo infecciones virales o abuso de alcohol, sin embargo los distintos mecanismos patológicos desembocan en un tramo final común, la producción de colágeno. Como muestran los resultados
5 experimentales en animales de los modelos no infecciosos anteriormente expuestos, la administración de parapoxvirus inactivados inhibe sorprendentemente la deposición de colágeno independientemente del agente nocivo causante.

Los parapoxvirus abren por tanto un nuevo principio terapéutico para la
10 acción sobre todos los tramos finales comunes de enfermedades que conducen a fibrosis.

Puede esperarse de este efecto una terapia especialmente eficaz también de la fibrosis hepática inducida viral con preparaciones de parapoxvirus, puesto que para dichas preparaciones son conocidas actividades
15 inmunoestimuladoras adicionales.

La potente actividad antifibrótica encontrada ahora de Baypamun® abre la posibilidad de utilizar Baypamun® o preparaciones de NZ2 como patrón de referencia para la evaluación del efecto antifibrótico en ensayos para descubrir sustancias antifibróticas.

20 Los parapoxvirus inactivados, o sus descendientes y preparaciones obtenidas de las cepas anteriormente citadas, poseen también un espectro de actividad antifibrótica universal, y son por tanto adecuados no sólo para la profilaxis y la terapia de enfermedades fibroticas del hígado, sino también de enfermedades fibróticas de otros órganos, como por ejemplo los pulmones, el
25 páncreas, el corazón y la piel. Es especialmente preferido el uso de aislados de

parapoxvirus en la profilaxis y el tratamiento de fibrosis hepática y cirrosis hepática

Según el problema clínico, se administra el agente terapéutico basado en parapoxvirus por vía sistémica, como por ejemplo intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, oral, por inhalación o local. El parapoxvirus se presenta a este respecto purificado y/o liofilizado, y se suspende inmediatamente antes de la administración en un disolvente adecuado, o se presenta en otra formulación adecuada, o se presenta en una forma de administración oral gastroresistente u otras

10 Pueden ser necesarias a este respecto varias administraciones o un tratamiento a largo plazo según un esquema temporal correspondiente a los requisitos del problema clínico

La presente invención se refiere al uso de aislados de parapoxvirus para la preparación de medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre fibrosis de órganos en seres humanos. Los aislados de parapoxvirus se obtienen a partir de las cepas D1701, orf-11, cepa 176 de orf griega, cepa 155 de orf griega, así como cepas de Nueva Zelanda (NZ) para la preparación de medicamentos con efecto profiláctico o curativo sobre fibrosis de órganos en seres humanos. Se utilizan preferiblemente cepas de Nueva Zelanda (NZ), las cepas NZ2, NZ7 y NZ10, para la preparación de medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre fibrosis de órganos en seres humanos, siendo especialmente preferida la cepa NZ2. Además, los parapoxvirus anteriormente descritos pueden modificarse mediante pases o adaptación en células adecuadas, y se utilizan dichos parapoxvirus obtenidos por pases o adaptación para la preparación de medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre

15
20
25

fibrosis de organos en seres humanos, pudiendose utilizar para los pases o la adaptacion por ejemplo células humanas como WI-38, MRC-5, células bovinas como BK-K13A47/Reg o MDBK y células ovinas como MDOK Pueden utilizarse tambien partes o fragmentos de los parapoxvirus citados

5 anteriormente para la preparación de medicamentos con actividad profilactica o curativa sobre fibrosis de organos en seres humanos Por partes se entienden fragmentos genómicos o subgenómicos expresados mediante vectores adecuados, como virus Vaccinia, en sistemas adecuados como cultivos celulares de fibroblastos, y por fracciones las fracciones obtenidas mediante

10 purificacion bioquimica como cromatografia de las particulas virales expresadas o disgregadas fisicamente, por ejemplo por acción de ultrasonidos Otro objeto de la invención es el uso de las cepas de *Parapoxvirus ovis* anteriormente citadas, o de los modificados obtenidos de ellas como se ha descrito anteriormente, en combinacion con otros agentes para la preparacion

15 de medicamentos y preparaciones farmaceuticas con actividad profilactica o curativa sobre fibrosis de organos en seres humanos, así como al uso de Baypamun[®], solo o en combinacion con otros agentes, para la preparacion de medicamentos y preparaciones farmaceuticas con actividad profilactica o curativa sobre fibrosis de organos en seres humanos Un objeto preferido de la

20 invencion es el uso de las cepas de *Parapoxvirus ovis* anteriormente citadas, o de los modificados obtenidos de ellas anteriormente descritos, en combinacion con otros agentes en una formulacion para administracion oral, por ejemplo en capsulas gastrorresistentes

Es ademas objeto de la invencion el uso de Baypamun[®] o de

25 preparaciones de NZ2 como referencia para la evaluacion del efecto

antifibrótico en ensayos para el descubrimiento de sustancias antifibroticas

La Parapoxvirus ovis NZ-2 citada aqui como ejemplo se deposito el 10 de julio de 2001 en la "European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology and Research", Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG,

5 Reino Unido El numero de deposito era

Ejemplo 1

Actividad de Parapoxvirus ovis, cepa D1701, Baypamun®

Metodologia

Se disolvio la sustancia seca Baypamun®, una preparacion obtenida a
10 partir de *Parapoxvirus ovis* cepa D 1701 quimicamente inactivada, segun la receta en agua para inyecciones (titulacion referida como TCID50 (dosis infecciosa para el 50% del cultivo de tejido) de aproximadamente 10^7 por ml)

Como solucion placebo se administró a los animales del grupo de control una solucion de poligelina con el mismo contenido de proteina que la solucion
15 de Baypamun®

Se administraron 0,5 ml de solución ip por animal y administración La administracion se llevo a cabo tres veces por semana, pero nunca en dias consecutivos

Se ensayo Baypamun® en dos modelos animales con distinta génesis de
20 la fibrosis, el modelo de tetracloruro de carbono y el modelo de suero porcino

El tratamiento cronico con tetracloruro de carbono es un procedimiento estandar para la provocación experimental de fibrosis hepática con cirrosis posterior (McLean E K , McLean A E M , Sutton P M , "Instant cirrhosis", Br J Exp Pathol 1969, 50 502-506) Es conocido en general como modelo de
25 fibrosis y cirrosis hepatica en seres humanos Se utilizaron ratas Sprague-

Dawley hembra Para una induccion maxima del metabolismo microsomal del tetracloruro de carbono, los animales recibieron 1 g/l de isoniazida con el agua de bebida ya una semana antes del inicio del tratamiento El tetracloruro de carbono se administró por via oral cada cinco dias a una dosis de 0,1 ml/100 g de peso corporal (tetracloruro de carbono aceite mineral= 1 1) Los animales se sacrificaron después de un tratamiento de siete semanas y se ensayaron El tratamiento con Baypamun® se llevó a cabo paralelamente al tratamiento con tetracloruro de carbono

El tratamiento con suero heterologo, por ejemplo suero porcino en ratas, es igualmente un procedimiento utilizado frecuentemente en la bibliografia para la provocacion de una fibrosis hepatica con cirrosis posterior, que en contraste con otros modelos causa solo un daño e inflamacion minimos a las celulas del parenquima hepatico (Bhunchet, E y Wake, K (1992) "Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis", Hepatology 16 1452-1473) Se trataron ratas Sprague-Dawley hembra ip dos veces por semana con 0,5 ml/animal de suero porcino esteril (Sigma), los animales de control con solucion salina fisiologica esteril (dos veces por semana 0,5 ml/animal, ip) El tratamiento con Baypamun® se realizo paralelamente al tratamiento con suero porcino, pero nunca el mismo dia Despues de un tratamiento de siete semanas, los animales se sacrificaron y se extrajeron los higados para la cuantificacion del contenido de colageno

Para el analisis histologico del tejido hepático se troquelaron cilindros de tejido transversal estandarizados (aproximadamente 10 x 2 mm) del lobulo anterior derecho del higado Se tiñeron los cortes congelados para la deteccion del colageno cicatricial producido por la fibrosis hepatica con una solucion de

rojo sirio picrico al 0,1%

Se utilizo Fast Green como colorante de contraste para reforzar el contraste. La extension de la fibrosis hepatica se determino en cada corte como la proporcion porcentual de superficie teñida con rojo sirio picrico de la superficie de medida total. Los parámetros de detección videomicroscópica del color se estandarizaron y se mantuvieron constantes en todo el experimento. Se midieron 64 campos de un retículo estandarizado de 31 mm² con una ampliación final de 50 veces.

Para la cuantificación de la extensión de la transformación de las células estrelladas hepáticas (HSC, también células Ito o células de almacenamiento de vitamina A) después del tratamiento agudo de ratas con tetracloruro de carbono, se detectaron inmunohistoquímicamente las células positivas de α -lactina de músculo liso. La superficie positiva de α -lactina de músculo liso se determinó con una ampliación final de 200 veces en cada corte en 16 campos centrilobulares respectivamente de 248 x 180 μ m. La transformación de HSC en células de tipo miofibroblasto productoras de colágeno y de factor de crecimiento es como es sabido la etapa decisiva en la provocación de fibrosis hepática. Por consiguiente, las HSC transformadas son un indicador temprano de actividad fibrogénica en el hígado.

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

Para la determinación de la prolina-OH se secaron 50-100 mg de tejido hepático y se hirvieron con HCl 6 N aproximadamente 17 horas. Después de evaporar el ácido en estufa de secado a vacío, se disolvió el residuo en 5 ml de agua destilada y se filtró. Se incubaron 200 μ l de la solución filtrada con 200 μ l

de etanol y 200 µl de solución de oxidación (solución de hidrato de cloramina T al 7% diluida 1:4 con tampón acetato-citrato, pH 6,0) 25 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadieron 400 µl de reactivo de Ehrlich (12 g de 4-dimetilaminobenzaldehído en 20 ml de etanol + 2,74 ml de ácido sulfúrico concentrado en 20 ml de etanol). Después de 3 horas de incubación a 35°C, se midió la absorción a 573 nm. Para la serie de calibración se utilizaron soluciones acuosas de prolina-OH (Sigma). Se calculó el contenido de prolina-OH de las muestras hepáticas en mg por g de peso seco de hígado.

Para el seguimiento de la formación de radicales de oxígeno reactivos se midió la concentración de α -tocoferol (α -TOC), un iniciador de radicales, en el hígado y la actividad de la enzima sensible a radicales 7-etoxirresorrufinodesetilasa (EROD) en el suero. Ambos parámetros están característicamente reducidos en la intoxicación por tetracloruro de carbono, y permiten una evaluación del grado de gravedad del daño tisular oxidativo.

El estado hepático de los animales se determinó mediante la medida de algunos parámetros estándar séricos: alaninaminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), aspartatoaminotransferasa (AST), γ -glutamilttransferasa (GGT), glutamato deshidrogenasa (GLDH), bilirrubina total (TBIL).

Resultados

El tratamiento con Baypamun® reduce significativamente la extensión de la degeneración fibrotica en el hígado en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (Fig. 1). Además, se observa una inhibición casi completa de la transformación de HSC (Fig. 2). La cantidad de células no parenquimáticas proliferativas en los hígados de animales tratados con Baypamun® está claramente reducida (Fig. 3). Las células no parenquimáticas incluyen HSC e

igualmente las células de cobre implicadas en la fibrogenesis

Los indicadores sericos del daño hepatocelular como ALT, AP, AST, GGT, GLDH y TBIL (tabla 1) muestran una tendencia a la normalizacion

La misma reduccion de las concentraciones de EROD y α -tocoferol en
 5 los grupos de control y los grupos tratados con Baypamun[®] documenta la presencia de radicales de oxigeno reactivos tóxicos por la intoxicación por tetracloruro de carbono en ambos grupos (tablas 1 y 2) Por tanto, puede excluirse un efecto "antifibrotico" de Baypamun[®] por una actividad detoxificante

En el modelo de suero, Baypamun[®] muestra una represion casi
 10 completa de la fibrosis (Fig 4) tanto el contenido de hidroxiprolina como la superficie teñida con rojo Sirio del higado se encuentran en las ratas tratadas con Baypamun[®] casi al nivel de los animales de control sanos, mientras que en las ratas de control tratadas con suero son varias veces mayores El aumento inducido por el tratamiento con suero porcino del contenido de colageno es en
 15 el grupo de Baypamun solo un 10% del valor correspondiente en el grupo de control

Ejemplo 2

Parapoxvirus ovis, cepa NZ2

Metodologia

20 Se propagaron virus NZ2 en pilas de cubetas Para ello se hacen crecer celulas BK clon 3A en placas de cultivo celular (37°C) durante 3 a 5 dias en 2 g de EMEM + FCS al 10% hasta que los cespedes de celulas estan de 90 a 100% confluentes Se utilizan 4 placas de cultivo celular por pila de cubetas como inoculo, y se completan con medio (2 g de EMEM + FCS al 10%) a un
 25 volumen de 2,5 l Después de 3 a 5 dias de incubacion a 37°C (cespedes de

células de 90 a 100% confluentes), se intercambio el medio por 2 g de EMEM sin adición de suero y se infectó el cultivo con virus NZ2 (MOI 0,001 a 0,01)

Después de alcanzar 100% de CPE (incubación a 37°C, aproximadamente 7 a 8 días), se recoge el virus. Para ello, se rellena la
5 suspensión viral en saquitos de medio estéril y se congela a -80°C. A continuación, la suspensión se descongela a 37°C en una estufa incubadora y se libera de células mediante una filtración intensa (tamaño de poro 5 µm). Posteriormente, se concentra la suspensión viral mediante ultrafiltración (corte de 100 kDa) por un factor de 20 a 40. Como alternativa, el virus puede
10 concentrarse mediante ultracentrifugación (Ti45, 30 000 rpm, 4°C, 60 min).

La titulación alcanzada mediante la concentración del virus contenido en la suspensión se determinó mediante titulación de células BK clon 3A. Después de ajustar la titulación viral a 6,0 con medio EMEM sin FCS, se inactivó térmicamente el virus durante 2 horas a 58°C. La inactivación se controló
15 mediante controles de inactivación en células BK clon 3A.

El *Parapoxvirus ovis*, cepa NZ2, se ensayó en el modelo ya utilizado en el ejemplo 1 de fibrosis hepática inducida por suero porcino en ratas. Se trataron ip ratas Sprague-Dawley hembra dos veces por semana con 0,5 ml/animal de suero porcino estéril (SIGMA), los animales de control con
20 solución salina fisiológica estéril (dos veces por semana con 0,5 ml/animal ip). La cepa NZ2 se administró ip tres veces por semana a las dosificaciones $1,5 \times 10^5$ y $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀/animal respectivamente (volumen de administración 0,5 ml/animal). Para la dosis inferior se diluyó el material con medio de cultivo celular (medio esencial mínimo de Eagle, Sigma). Los animales de control se
25 trataron con medio de cultivo celular. El tratamiento con la cepa NZ2 se realizó

paralelamente al tratamiento con suero, pero nunca el mismo día. Después de siete semanas de tratamiento se sacrificaron los animales, se extrajeron los hígados y se cuantificó la fibrosis hepática tanto morfométricamente como por el contenido de prolina-OH. La metodología para ello se ha descrito ya en el ejemplo 1.

Resultados

Los resultados de las determinaciones de colágeno se representan en la Fig. 5. Sorprendentemente, el tratamiento con la cepa NZ2 puede reprimir la formación de fibrosis hepática. Los animales de control tratados con suero muestran en comparación con los animales sanos un claro aumento del contenido de prolina-OH y del colágeno coloreable con rojo Sirio. Este aumento se reduce mediante NZ2 dependiendo de la dosis. Resulta sorprendente también la extensión del efecto: la dosis de 5×10^5 TCID₅₀ reducía el aumento del contenido de colágeno en el hígado a menos de un 10% del valor de control. Una evaluación cualitativa del preparado histológico dio como resultado que la proporción de animales con septos de colágeno se reducía de un 93% (14/15) a un 33% (5/15) en el grupo de $1,5 \times 10^5$ TCID₅₀ y a un 0% en el grupo de $5,0 \times 10^5$ TCID₅₀.

Ejemplo 3

Actividad antifibrotica de PPVO tras administración oral

Se formuló el PPVO como un liofilizado seco en capsulas gastroresistentes (Elanco, Indianapolis, EE UU).

Se trataron cuatro grupos de seis animales de ensayo cada uno de la siguiente manera: un grupo de control (grupo 1) recibió sólo una cápsula gastroresistente (sin PPVO) administrada por vía oral, y además se inyectó ip

solucion salina esteril (0,5 ml/animal) En el grupo 2, se administro oralmente una cápsula gastrorresistente (sin PPVO) junto con 0,5 ml de tetracloruro de carbono/animal, y se inyectaron ip 0,5 ml de solución salina fisiologica Los animales del grupo 3 recibieron otra vez una capsula gastrorresistente (sin PPVO) junto con 0,5 ml de tetracloruro de carbono/animal administrado por via oral Los animales del grupo 3 recibieron ademas PPVO D1701 (dosis 5×10^6 TCID₅₀/animal) inyectado ip en 0,5 ml de agua para inyecciones El grupo 4 recibio PPVO D1701 (dosis 5×10^6 TCID₅₀/animal formulado en una capsula gastrorresistente) junto con 0,5 ml de tetracloruro de carbono administrado por via oral Los animales del grupo 4 recibieron además 0,5 ml de solucion salina esteril inyectada ip

Despues de 48 horas, se extrajeron los higados y se determinaron inmunohistoquímicamente en cortes de tejido representativos las superficies centrolobulares positivas de α -lactina de musculo liso (α -SMA) en % de la superficie de medida total para cada animal (Johnson S J , Hines J E, Burt A D , "Phenotypic modulation of perisinuosoidal cells following acute liver injury a quantitative analysis", Int J Exp Path, 1992, 73 765-772) Este valor es una medida de la transformacion de las celulas estrelladas hepáticas

Se llevan a cabo dos grupos de ensayos segun la descripcion anterior Los resultados del ensayo del primer grupo de ensayos se reproducen en la tabla 3, los resultados del segundo grupo de ensayos en la tabla 4

En el grupo de ensayos 1, la proporcion de superficie centrolobular positiva de α -SMA en tejido hepatico de animales que recibieron PPVO D1701 administrado ip (grupo 3) es inexplicablemente (y al contrario que en las demas experiencias experimentales) mayor que en animales a los que no se ha

administrado PPVO Por esta razón, se llevó a cabo el grupo de ensayo 2 como experimento de repetición

En ambos grupos de ensayo, se comprobó coincidente y sorprendentemente después de la administración oral de PPVO D1701 (correspondiente al grupo 4) una inhibición de aproximadamente un 50% de la transformación frente al grupo de control (correspondiente al grupo 2) En el grupo de ensayo 2, la inhibición de la transformación después de la administración oral de PPVO D1701 (grupo 4) es igualmente eficaz que en la administración peritoneal de PPVO D1701 (grupo 3)

A partir de estos resultados puede deducirse que el PPVO despliega su actividad antifibrotica también tras administración oral

Tabla 1

Influencia de Baypamun® sobre los parámetros séricos del estado hepático y los indicadores de una intoxicación							
	ALT	AST	AP	GGT	GLDH	TBIL	EROD
	U/l	U/l	U/l	U/l	U/l	µmol/l	nmol x g/min
Controles	49,1	45,7	162,8	0,8	12,5	1,6	0,30
SEM	3,7	8,7	14,76	0,2	7,9	0,2	0,02
Tetracloruro de carbono	95,6	92,4	392,7	6,1	37,1	2,9	0,15
SEM	14,7	14,1	43,0	1,3	14,8	0,3	0,01
T + Baypamun®	72,0	65,9	329,5	4,5	18,2	1,9	0,17
SEM	9,9	9,1	26,9	0,8	4,0	0,2	0,03

ALT Alaninaminotransferasa GLDH glutamatodeshidrogenasa
 AST Aspartatoaminotransferasa TBIL bilirrubina total
 AP fosfatasa alcalina EROD 7-etoxirresorrufindesetilasa
 5 GGT γ-glutamilttransferasa

Tabla 2

Influencia del Baypamun®	
Sobre α-tocoferol del hígado	
	α-tocoferol nmol/g de tejido
Control	73,1
SEM	2,2
Tetracloruro de carbono	35,7
SEM	2,3
T + Baypamun®	38,5
SEM	6,1

Tabla 3

Influencia del PPVO tras administración intraperitoneal u oral sobre la transformación de células estrelladas hepáticas tras la administración de una dosis fibrogénica de tetracloruro de carbono (conjunto de ensayos 1)

5

Fibrosis	Administración	DOSIS	α -SMA (%)
Grupo 1 Intacto	Cápsula vacía oral + agua para inyecciones ip	-	$0,28 \pm 0,04$
Grupo 2 Tetracloruro de carbono	Cápsula vacía oral + agua para inyecciones ip	-	$2,76 \pm 0,79$
Grupo 3 Tetracloruro de carbono	PPVO en agua para inyecciones ip + capsula vacia oral	5×10^6 TCID ₅₀ /animal	$5,05 \pm 2,00$
Grupo 4 Tetracloruro de carbono	PPVO en cápsula oral + agua para inyecciones ip	5×10^6 TCID ₅₀ /animal	$1,46 \pm 0,34$

Tabla 4

Influencia del PPVO tras administracion intraperitoneal u oral sobre la transformacion de celulas estrelladas hepáticas tras la administración de una dosis fibrogénica de tetracloruro de carbono (grupo de ensayo 2)

5

Fibrosis	Administración	DOSIS	α -SMA (%)
Grupo 1 Intacto	Cápsula vacía oral + agua para inyecciones ip	-	$0,20 \pm 0,04$
Grupo 2 Tetracloruro de carbono	Cápsula vacía oral + agua para inyecciones ip	-	$3,18 \pm 0,56$
Grupo 3 Tetracloruro de carbono	PPVO en agua para inyecciones ip + capsula vacia oral	5×10^8 TCID ₅₀ /animal	$1,22 \pm 0,35$
Grupo 4 Tetracloruro de carbono	PPVO en cápsula oral + agua para inyecciones ip	5×10^8 TCID ₅₀ /animal	$1,55 \pm 0,34$

0-1	Formulario PCT/RO/134 (EASY) Datos de un microorganismo depositado y/u otro material biológico depositado Elaborado utilizando	
0-1-1		PCT EASY versión 2.91 (Actualizada a 1-1-2001)
0-2	Número de referencia internacional	
0-3	Número de referencia del solicitante o procurador	LEA3474-WO
1	Los siguientes datos se refieren al microorganismo y/u otro material biológico que se cita en la memoria en	
1-1	Página	5
1-2	Replón	11
1-3	Datos referidos al depósito	
1-3-1	Nombre del lugar de depósito	European Collection of Cell Cultures Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido
1-3-2	Datos del lugar de depósito	
	Fecha del depósito	10 de julio de 2001 (10-7-2001)
	Número de entrada	ECACC
1-4	Otros datos	NINGUNO
1-5	Países designados a los que se aplican los datos especiales	Todos los países designados
1-6	Datos presentados separadamente Estos datos se transmitirán después a la Oficina Internacional	NINGUNO
A RELLENAR POR EL SERVICIO DE SOLICITUDES		
0-4	Este formulario entra con la solicitud internacional (sí o no) Sí	11 de julio de 2001
0-4-1	Funcionario autorizado	(Sabino Aulbers)
A RELLENAR POR LA OFICINA INTERNACIONAL		
0-5	Este formulario entra en la siguiente fecha en la Oficina Internacional	15 de noviembre de 2001
0-5-1	Funcionario autorizado	

10

18

Habiéndose descrito la invencion como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1 Uso de aislados de parapoxvirus para la preparacion de
medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre las fibrosis de órganos
en seres humanos

2 Uso de un aislado de parapoxvirus, por ejemplo de las cepas D
10 1701, orf-11, cepa 176 de orf griega, cepa 155 de orf griega, así como las
cepas de Nueva Zelanda (NZ) para la preparación de medicamentos con
actividad profilactica o curativa sobre las fibrosis de organos en seres
humanos

3 Uso de aislado de parapoxvirus segun las reivindicaciones 1-2, en
15 el que se utilizan como cepas de Nueva Zelanda (NZ) las cepas NZ2, NZ7 y
NZ10 para la preparacion de medicamentos con actividad profilactica o curativa
sobre las fibrosis de organos en seres humanos

4 Uso de parapoxvirus de las reivindicaciones 1-3 modificados
mediante pases o adaptacion en células adecuadas para la preparacion de
20 medicamentos con actividad profilactica o curativa sobre las fibrosis de organos
en seres humanos

5 Uso de los parapoxvirus de las reivindicaciones 1-3 modificados
mediante pases o adaptacion en células adecuadas para la preparacion de
medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre las fibrosis de organos
25 en seres humanos, en el que se utilizan para los pases o adaptacion celulas

humanas como WI-38, MRC-5, células bovinas como BK-K13A47/Reg o MDBK y células ovinas como MDOK

6 Uso de partes o fracciones de los virus según las reivindicaciones 1-5 para la preparación de medicamentos con actividad profiláctica o curativa sobre las fibrosis de órganos en seres humanos, en el que por partes se entiende los fragmentos genómicos o subgenómicos expresados mediante vectores adecuados, por ejemplo virus Vaccinia, en sistemas adecuados como cultivos celulares de fibroblastos, y por fracciones se entiende las fracciones obtenidas mediante purificación bioquímica como cromatografía de las partículas virales expresadas o disgregadas físicamente

7 Uso de uno de los aislados correspondientes a las reivindicaciones 1-6 en combinación con otros agentes para la preparación de medicamentos y preparaciones farmacéuticas con actividad profiláctica o curativa sobre las fibrosis de órganos en seres humanos

8 Uso de Parapox ovis D1701 solo o en combinación con otros agentes para la preparación de medicamentos y preparaciones farmacéuticas con actividad profiláctica o curativa sobre las fibrosis de órganos en seres humanos

9 Uso de Parapox ovis D1701 o preparaciones de NZ2 como patrón de referencia para la evaluación de los efectos antifibroticos en ensayos para el descubrimiento de sustancias antifibroticas

10 Uso de Parapoxvirus ovis D1701 correspondiente a la reivindicación 8, en el que las preparaciones farmacéuticas y medicamentos son adecuados para administración oral

USO DE CEPAS DE PARAPOXVIRUS OVIS FRENTE A FIBROSIS DE
ÓRGANOS

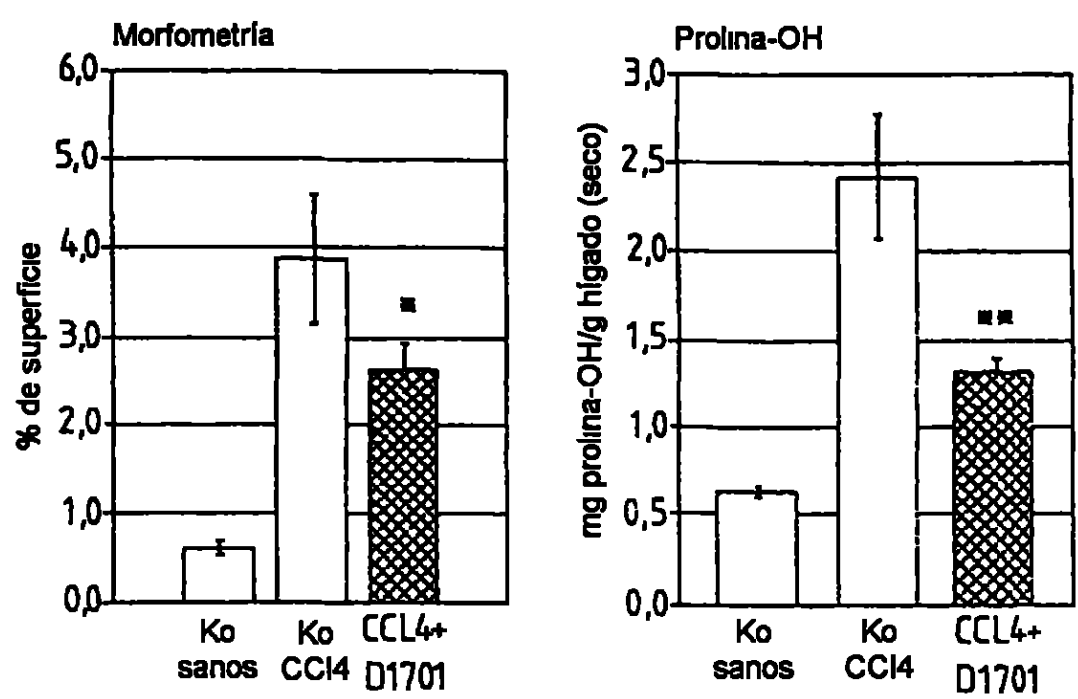
RESUMEN

5

La presente invencion se refiere al uso en seres humanos de parapoxvirus inactivados en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades que estan acompañadas por una elevada deposicion de colágeno, pudiendo estar afectados tanto órganos internos, por ejemplo el higado, como la piel y sus

10 anejos Se refiere especialmente a fibrosis hepatica o a cirrosis hepatica como consecuencia de hepatitis viral o a enfermedades hepaticas inducidas por el etanol, asi como a fibrosis quistica

Fig 1



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

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

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

2/4

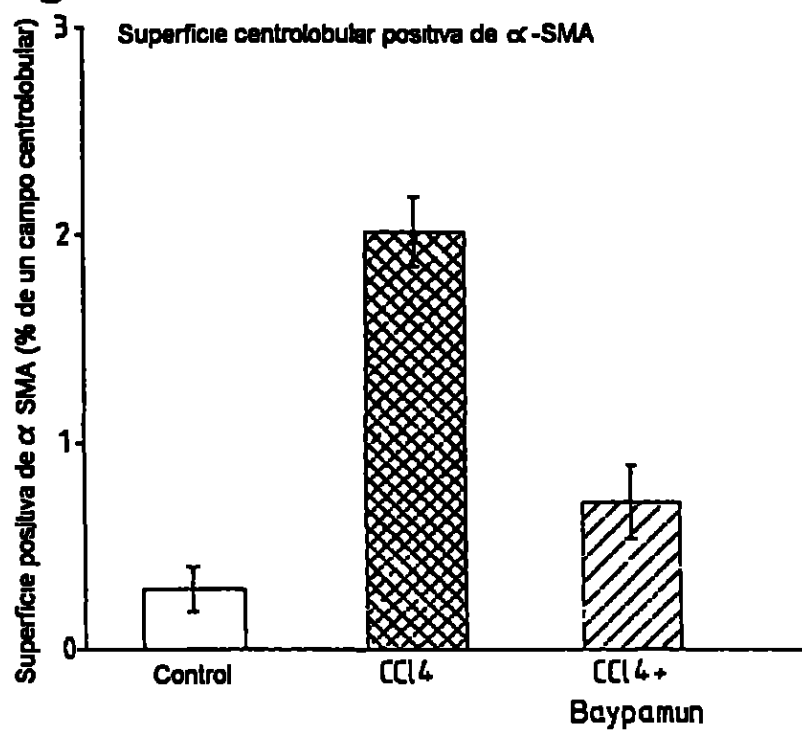
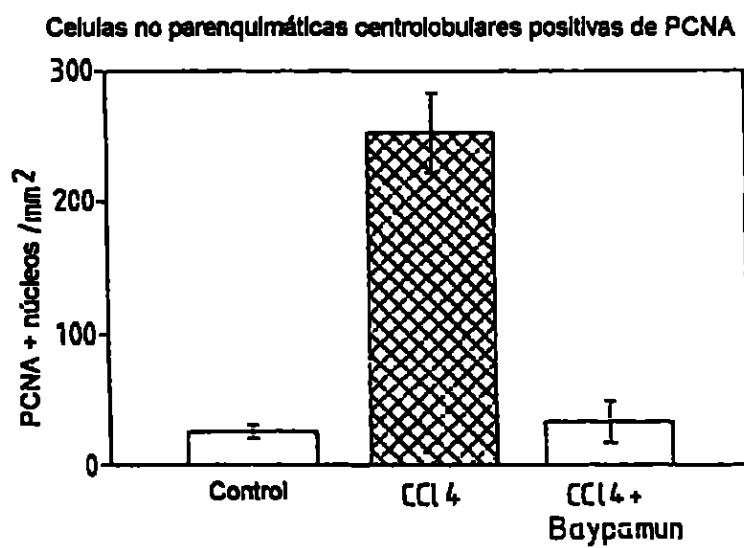
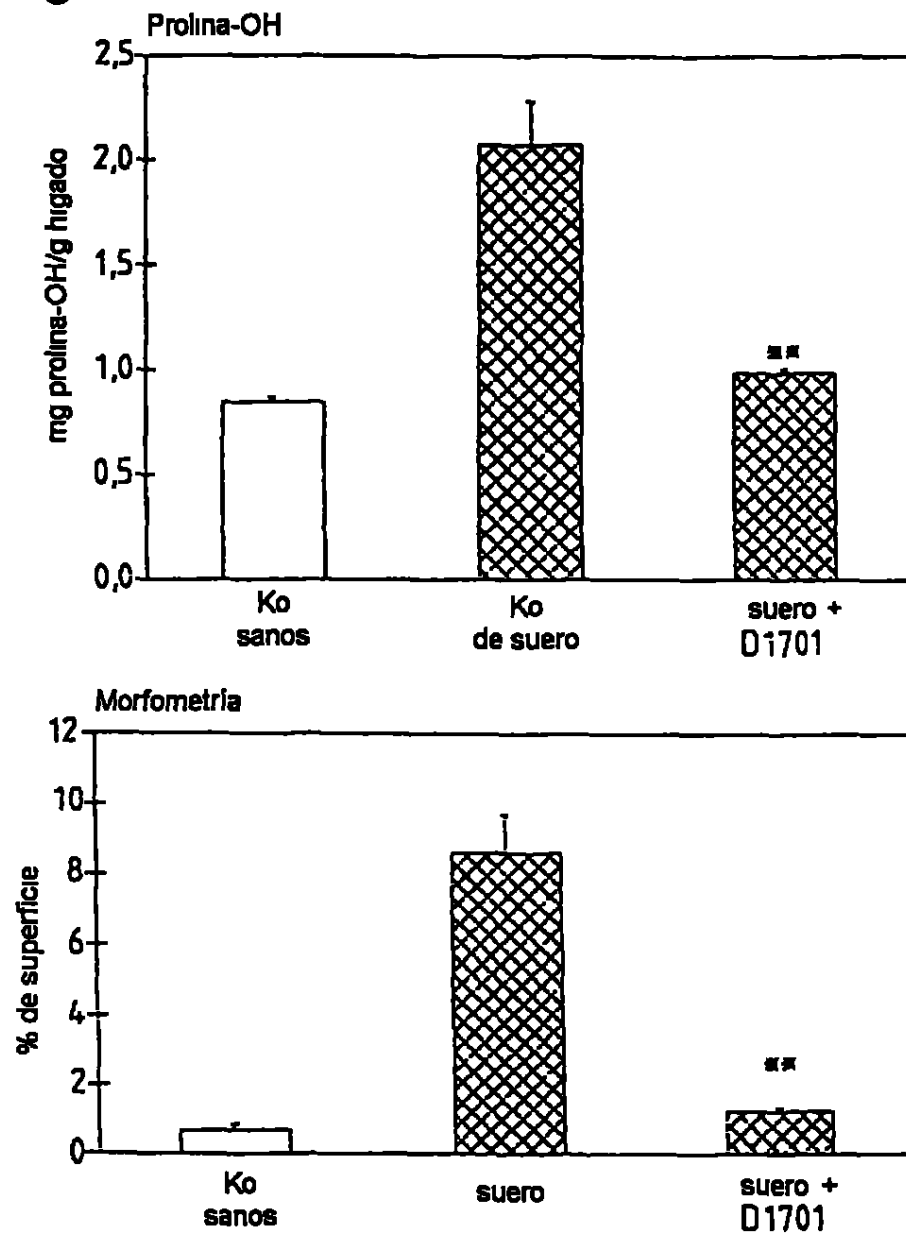
Fig 2**Fig 3**

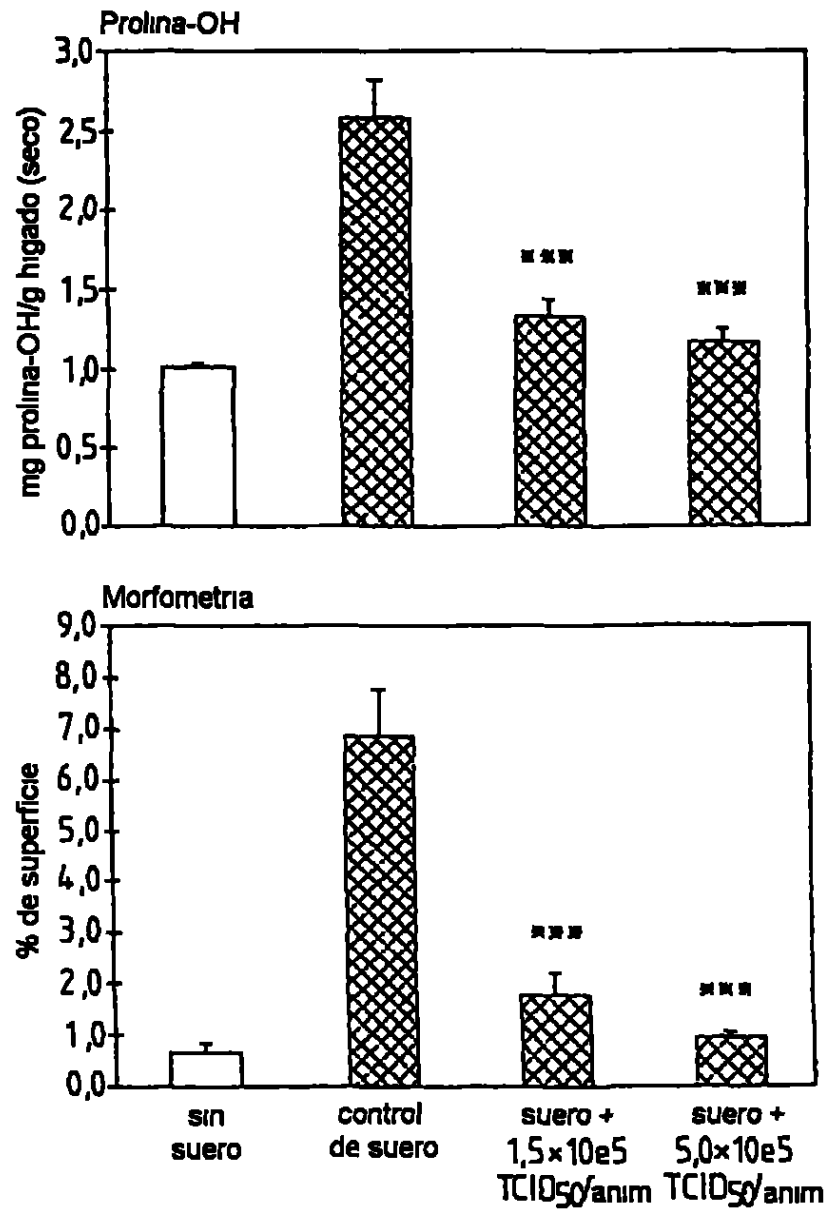
Fig 4

Efecto de PPVO D1701 (Baypamun®) sobre la fibrosis hepatica inducida por suero porcino Dosis 5×10^6 TCDI₅₀/animal

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

**p<0,01 (test de Kolmogorow-Smirnow) frente a Ko de suero

Fig 5



Efecto de PPVO NZ2 sobre la fibrosis hepática inducida por suero porcino

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

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

NIT : 800176009-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03001020 00000000

Folios: 92 **rcio**

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 104
FECHA : ENERO 2 DE 2003

Fecha (AMD): 2003-01-09 17:14:05

Trámite: 011 ACT. PATENTE 279.696.000.000
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CIA

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PASO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3136954	02/01/2003	34,706,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

0000 0898 - 841-011-1

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente			()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.			()
- Descripción de la invención.			()
- Dibujos de ser estos pertinentes.			()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.			()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()			
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño		()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()			
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud		()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado		()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas		()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable

ANDREA POSSE

Fecha



7A

2020
Bogotá, D C ,

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Oficio N°
05557

ASUNTO	Radicación N°	03-1020
	Solicitud Internacional	PCT/EP2001/007978
	Fecha Inicio fase nacional	11/02/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	330
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486)

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica N° 10 de 2001


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 19 JUL 2003.