

201482

201482

INDUSTRIAL



MEMORIA DESCRIPTIVA
DE UNA PATENTE DE INVENCION, POR VEINTE AÑOS EN ESPAÑA,
A FAVOR DEL DR. JOSEF HAMMERSCHMID, DE NACIONALIDAD ALE-
MANA, RESIDENTE EN MUNICH (Alemania) Reifenstuelstr. 12,
s o b r e:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN EXTRACTO DE TEJIDO Y
DE UN SUERO ESTIMULADO MEDIANTE ESTE EXTRACTO".

Inventor: El solicitante de nacionalidad alemana.

201482



La presente invención es totalmente nueva en España, no habiendo sido explotada ni en nuestro país ni en el extranjero con anterioridad a la fecha de la prioridad que se reivindica.

5 La invención se refiere aun procedimiento de preparación de un extracto de tejido celular y de un suero estimulado por este extracto.

Es corriente servirse de tejidos celulares para extraer de ellos sustancias supuestas activas y para obtener sustancias susceptibles de provocar efectos terapéuticos en el sujeto tratado y permitir retirar de él un suero estimulado.

Es conocido que se puede estimular un suero con un tejido quemado, suero que puede servir entonces contra las quemaduras. Pero en este caso el material muerto es empleado como estimulante.

15 Por otra parte se ha recomendado el suero que contenga sustancias denominadas "hormonas vulnerarias", estimulado por la sangre de la persona misma. Pero este procedimiento no emplea mas que sangre como estimulantes, por lo cual es un material celular todavia no transformado.

20 La presente invención se encamina por sendas completamente desconocidas hasta la fecha. Tiende a preparar extractos a partir de tejidos vulnerarios de granulación viviente y creciente.

La invención tiene por objeto obtener de extractos a partir de tejidos de especies variadas, tejidos similares y, si es posible, de la misma especie y que servirán entonces a los fines terapéuticos directos para degeneraciones, o malas regeneraciones, 25 tale como tumores malignos, llagas no cicatrizantes, cirrosis de higado, encogimiento de los riñones, etc.,. Estos extractos servirán también para producir suero sanguíneo estimulado inyectándoles en dosis masivas a animales donantes de sangre.

30 Para obtener los extractos según esta invención, se practica



sobre los animales, jóvenes y preferentemente impúberes, incisiones tan extendidas como sea posible de una profundidad que preferentemente varia de cuatro a cinco veces el espesor de la epidermis. Comenzado el proceso de curación, entre el séptimo y el
5 quinceavo día postoperatorio aproximadamente, la herida es abierta de nuevo y el conjunto del tejido de granulación formado en la llaga, estirpado. Este tejido sirve entonces para la extracción según los métodos conocidos universalmente y habitualmente empleados.

10 Los tejidos de granulación vulneraria provenientes de la extracción "in vivo", serán tratados de la forma siguiente: será preparado primeramente un extracto acuoso o un extracto compuesto acetona-éter-acuoso. Los extractos así obtenidos podrán hallar inmediatamente una utilización terapéutica. Pero podrán también
15 servir para la preparación de un suero estimulado, inyectando los en dosis masivas a animales a los cuales será retirada, después de seis o siete días, sangre, que proporcionará entonces el suero estimulado, por el procedimiento centrifugo conocido.

Ahora bien según el procedimiento anteriormente indicado,
20 el extracto especial vulnerario es preparado practicando incisiones en animales preferentemente impúberes y, después de siete a quince días preferentemente, se recorta el tejido de granulación cultivado, extrayéndose en la forma conocida, con lo cual puede ser preparado con este extracto vulnerario suero estimulado. Este
25 procedimiento presenta todavía algunos inconvenientes descubiertos.

Uno de estos inconvenientes consiste en que la extracción de tejido de granulación precisa puede ser obtenida exclusivamente de animales vivos. Mediante la incisión en animales vivos se opera
no solo una importante disminución de peso, sino también pérdida
30 de tejido de granulación debido a las llagas supurantes. Se precisa



por otra parte mediante este modo de realización un gran número de animales, por lo que el procedimiento resulta muy costoso.

Como perfeccionamiento del procedimiento se ha descubierto ahora que semejante extracto también puede ser obtenido ventajosamente cultivando "in vitro" el tejido preparado.

Es conocido que se puede cultivar, según el método de Alexis Carrell, tejidos en las "Botellas de Carrell" o en los "Tubos-Roll". Experiencias importantes han demostrado, sin embargo, que el cultivo de tejidos para la preparación de extractos celulares según la presente invención no ha dado resultado satisfactorio. Se rechaza, pues, esto para el procedimiento presente. Ello es que la invención suprime los defectos existentes, haciendo posible el cultivo "in vitro" de los cultivos celulares extraídos "in vivo" y la extracción de sustancias que sirven para la preparación del suero.

La invención tiene por objeto obtener de los extractos a partir de tejidos de vitro-cultivos, tejidos de especies variadas, multiplicándose al máximo, extractos de tejidos similares, y de ser posible, de la misma especie, y que servirán entonces para fines terapéuticos directos, en degeneraciones o malas regeneraciones tales como tumores malignos, llagas no cicatrizantes, cirrosis del hígado, encogimiento de los riñones etc.,. Estos extractos servirán también para producir suero sanguíneo estimulado, inyectándoles en dosis masivas a animales donantes de sangre. A este fin y según la invención, los tejidos obtenidos "in vivo" son cultivados "in vitro" excitando su actividad de "mitosis". Esto es conseguido insuflando aire aséptico a presión, según el método conocido, en una incubadora calentada a temperatura regulable, proporcionando así un interior completamente aséptico. En esta incubadora las bandejas están dispues-



tas para recibir el plasma nutritivo. Por encima de cada bandeja se encuentra un pulverizador por el cual los cultivos son rociados, a intervalos regulares, por el líquido nutritivo.

5 El plasma nutritivo es preparado a partir de sangre extraída bajo asepsia, preferentemente de mamíferos o volátiles, y dado el caso del hombre, añadiendo sustancias anticoagulantes (tales como "heparina", ácido cítrico, etc.,) y separando el suero del plasma por el procedimiento centrífugo. Este plasma es colocado en espesor conveniente sobre las bandejas-soporte previamente para-

10 finadas.

En este plasma nutritivo son implantados los cultivos extraídos bajo precauciones asépticas, que son entonces incubados a una temperatura de 34 a 37°C. En un ciclo de tres horas aproximadamente, sobre el cultivo en crecimiento es vaporizado el

15 líquido nutritivo, compuesto de una solución de "tyrode" modificado por azúcar de uvas (dextrosa), jugo embrionario, jugo de bazo o de hígado y suero resultante de la preparación del plasma.

Esta solución nutritiva será proporcionada de forma que las condiciones óptimas de la "mitosis" sean creadas para los cultivos

20 celulares. Y esto, variando la proporción de jugo embrionario, de bazo o de hígado frente a la proporción de suero, de igual modo que adicionando sustancias estimulando la "mitosis" y dando siempre preferencia a los extractos de granulación vulneraria obtenidos por el procedimiento primeramente descrito.

25 El tejido que sirve para el cultivo, es un tejido específico, como músculos, mucosas, hígado, tejido conjuntivo, etc., que será cultivado, bien en cultivo puro, o bien en tejido de granulación vulneraria, extraído "in vivo". En la medida de lo posible este tejido debe provenir del hombre o de la especie para la cual

30 el extracto deberá encontrar su utilización terapéutica.



Después que el cultivo se haya visiblemente desarrollado, del segundo al quinto día aproximadamente, será herido en varios lugares con precaución.

5 Después de un periodo de crecimiento óptimo dado, preferentemente de cinco a quince días, el cultivo será extraído y depurado del fondo del plasma. A partir de este cultivo el extracto celular será preparado con el método comúnmente conocido y anteriormente descrito.

10 Será preparado primeramente un extracto acuoso o un extracto compuesto de acetona-éter-acuoso. Los extractos así obtenidos podrán encontrarse inmediatamente una utilización terapéutica. Pero pueden servir también para la preparación de un suero estimulado inyectándoles en dosis masivas a animales a los cuales será extraída, después de seis o siete días, sangre que proporcionará
15 entonces el suero estimulado, por el procedimiento centrífugo conocido.

Más abajo la presente invención se explica con ayuda de algunos ejemplos, sin que se quiera por ello imponer como absolutas las indicaciones de cantidades, tiempos y temperaturas. Por
20 el contrario, el especialistas acostumbrado a estas operaciones podrá proceder a todo género de modificaciones.

EJEMPLO I.-

Sobre animales jóvenes, robustos y preferentemente impúberes,
25 se practicarán heridas (incisiones) de una profundidad de cuatro a cinco veces el espesor de la epidermis. Después de llegada la curación, las llagas serán abiertas de nuevo, entre el séptimo y quinceavo día post-operatorio, y el conjunto del tejido de granulación será estirpado e introducido inmediatamente en
30 acetona.



El tejido así extraído será homogeneizado mecánicamente, con precauciones asépticas, y mezclado con cuatro veces su peso de acetona. Esta mezcla reposará en la cámara fría durante veinticuatro horas aproximadamente, o será inmediatamente emprendida la extracción durante treinta minutos. La acetona será destilada, la sustancia restante será mezclada con una vez su peso de acetona-éter 1 a 1, después de diez minutos destilada de nuevo y después de treinta minutos se procederá a una nueva extracción por éter puro durante de diez a treinta minutos. La extracción será efectuada con ayuda de aparatos de batir. Se procederá a la extracción del polvo seco de acetona-éter, resultante de la destilación en el vacío, después de haber mezclado este polvo con agua destilada y/o solución "Ringer", y esto en toluol en la cámara fría, durante veinticuatro horas, a una temperatura de alrededor de + 2°C y con la ayuda de un aparato de batir. Con ello se envía por una parte de peso de polvo seco por término medio aproximadamente de diez a veinte veces su volumen de agua. El extracto acuoso así obtenido puede ser o bien directamente aplicado, o bien retirando la albúmina común en el punto isoeléctrico entre pH 5,2 a 8,1, precipitado fraccionario, o bien conservándolo mediante tubos de celofán dialítico. Los extractos así obtenidos, una vez así encerrados en el vacío, entonces el extracto de acetona absorbido, con alcohol, integra el tejido de partida para la estimulación del suero.

25 EJEMPLO II.--

Los extractos obtenidos por el procedimiento del ejemplo I, sea el extracto acuoso, sea el extracto lipóide, sea separados, sea compuestos, serán inyectados en inyección intramuscular a un buey o a un caballo joven y robusto. Después de un lapso de tiempo, de seis a ocho días preferentemente, será extraída sangre del animal



tratado y el suero estimulado será extraído según el método habitual por procedimiento centrífugo. Este suero será pasado por el filtro antibacterico.

Según la invención es posible obtener extractos muy eficaces a partir de tejidos extraídos "in vivo". Estos extractos serán entonces empleados en los tratamientos de malas regeneraciones, de-generaciones, tumores malignos, cirrosis del hígado, llagas no cicatrizantes, etc., y servirán igualmente para la preparación de suero sanguíneo estimulado.

10 EJEMPLO III.-

Sobre una persona humana, joven y robusta, será practicada, con precauciones asepticas, una herida que alcanzará la epidermis, encontrándose por encima el tejido conjuntivo sucutáneo así como una capa de músculo. Llegada la curación aséptica, se espera la regeneración del tejido por granulación vulneraria y se separará seguidamente el tejido de granulación del músculo y el tejido conjuntivo, siempre con asepsia.

Este tejido será implantado en capas delgadas sobre el plasma nutritivo descrito anteriormente. La pulverización periódica se hará con un líquido compuesto como sigue: 1000 ccm. de solución "tyrode", 12 g. de azúcar de uva, 5 ccm. de jugo embrionaria, 20 ccm. de extracto de granulación vulneraria y 1 ccm. de suero proveniente de la preparación del plasma. La pulverización se hará a intervalos determinados, más bien cada tres horas. Después de que el cultivo esté visiblemente desarrollado, al 2º y 3º día, aproximadamente, será herido en varios lugares con precaución.

Después de un periodo óptimo de crecimiento, de 6 a 8 días preferentemente (según el género del tejido, por ejemplo: epitelio, mas largo tiempo que tejido conjuntivo o mesenquima), el

201482



cultivo será extraído y separado mecánicamente del plasma y por solución "Ringer".

El tejido así extraído será homogeneizado mecánicamente, con precauciones asépticas, y mezclado con cuatro veces su peso de acetona. Esta mezcla reposará en la cámara fría durante 24 horas aproximadamente, o será inmediatamente emprendida la extracción durante 30 minutos. La acetona será destilada, la sustancia restante será mezclada con una vez su peso de acetona-éter 1 a 1, después de 10 minutos, destilada de nuevo, y después de 30 minutos se procederá a una nueva extracción por éter puro durante de 10 a 30 minutos. La extracción será efectuada con ayuda de aparatos de batir. Se procederá a la extracción del polvo seco de acetona-éter, resultante de la destilación en el vacío, después de haber mezclado este polvo con cien veces su peso de agua destilada, en la cual será integrado una vez y media el peso del polvo seco de solución "Ringer", y esto bajo toluol en la cámara fría durante veinticuatro horas, a una temperatura aproximadamente de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con la ayuda de un aparato de batir. El extracto acuoso así obtenido será reducido en el vacío a una vez y media el peso del polvo seco que era el origen. Este extracto será introducido en ampollas de diez cm. y deshidratado en la cámara fría, según el método habitual, hasta quedar la sustancia seca, o bien empleando directamente el mismo según las instrucciones anteriormente indicadas. El extracto de acetona-éter será reducido, al máximo, en el vacío y el depósito del lipóide será absorbido por alcohol para ser empleado a su tiempo directamente según las anteriores instrucciones.

EJEMPLO IV.-

Sobre un cerdo, joven y rebusto, se practicará una incisión operatoria en el borde anterior del hígado, incisión que será ce-



rrada por puntos de "catgut". Después de un periodo de seis días aproximadamente, la región de granulación será extraída y cultivada "in vitro" como ha sido descrito en el curso del ejemplo III.

5 Se procederá de forma análoga para otros órganos, por ejemplo materias óseas en fracturas. En la medida en que sea posible es preferible tomar como partida tejidos provenientes de personas humanas.

EJEMPLO V.-

10 Los extractos obtenidos por el procedimiento de los ejemplos III y IV, sea el extracto acuoso, sea el extracto de lipóide, sea separado, sea compuestos, será inyectado en inyecciones intramusculares a un buey o a un caballo joven y robusto. Después de un lapso de tiempo, seis u ocho días preferentemente, la sangre del animal tratado será extraída y el suero estimulado será
15 también obtenido de ella según el método habitual por procedimiento centrífugo. Este suero será pasado por el filtro antibacterico.

20 Según la invención es posible, desechando la costosa obtención de tejido "in vivo", extractos de tejido terapéuticos muy eficaces, evitándose caer en heridas infectadas, así como costosos y voluminosos establos, siendo posible mantenerle fresco y aumentante el tejido cultivado "in vitro" de diferentes tejidos específicos, utilizable para degeneraciones, malas regeneraciones, tumores malignos, cirrosis del hígado, encojimiento de los riñones,
25 llagas no cicatrizantes, etc., en empleo terapéutico directo, o bien se utilizarán para la preparación de un suero sanguíneo estimulado.

30 La idea descrita en la precedente memoria es susceptible de ser variada en sus diversas formas de realización no agotadas ni mucho menos en los anteriores ejemplos, todo ello sin que varíe



la esencia de la misma, que se reivindica en la siguiente

NOTA

En resumen, la presente patente de invención recaerá sobre las siguientes reivindicaciones:

5

1ª.-Procedimiento de preparación de un extracto de tejido y de un suero estimulado mediante este extracto, caracterizado porque dicho extracto de tejido celular se obtiene practicando heridas sobre animales, impúberes preferentemente o sobre personas humanas, y extirpando, después de la curación y del séptimo al quinceavo día post-operatorio, el tejido de granulación vulneraria, cuyo extracto será preparado según los métodos habituales.

10

15

2ª.-Procedimiento, según la anterior reivindicación, caracterizado porque la preparación del suero estimulado consiste en emplear el extracto vulnerario obtenido según la anterior reivindicación, el cual, después de retirada la albúmina común, en la forma conocida mediante precipitación en el punto isoeléctrico entre pH 5,2 a 8,1 y filtración dialíctica, es inyectado preferentemente en animales impúberes, después de siete a ocho días preferentemente de este tratamiento, se extrae la sangre de dichos animales, y de ella es obtenido el suero en la forma conocida.

20

25

3ª.-Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, de acuerdo con dichas reivindicaciones anteriores, un extracto de tejido celular es obtenido implantando tejidos extraídos "in vivo", según el procedimiento de las anteriores reivindicaciones, sobre bandejas-soportes parafinados y provistos de plasma nutritivo, cultivos estos que son rociados periódicamente con un líquido nutritivo a través de un sistema de pulverización colocado encima de ellos, siendo haridos después

30

201482



del desarrollo y de un periodo de crecimiento propicio, de seis a ocho dias preferentemente, siendo los extractos de los cuales preparados según los métodos habituales.

5 4^a.--Procedimiento, según la anterior reivindicación, caracterizado porque pueden realizarse las operaciones de la reivindicación precedente empleando botellas Carrell o tubos Roll, con idéntico resultado.

10 5^a.--Procedimiento, según las reivindicaciones 3^a y 4^a, caracterizado porque se fija la composición del líquido nutritivo empleado para la pulverización sobre los ~~tejidos~~ tejidos como sigue: solución "tyrode" a la cual son mezclados alrededor del un entero, dos décimas por ciento de dextrosa, alrededor del seis y medio por ciento de jugo embrionario, alrededor del veinte por ciento de un extracto de granulación vulneraria y alrededor de una décima de entero por ciento de suero.

15 6^a.--Procedimiento, según la anterior reivindicación, caracterizado porque se obtiene un suero estimulado inyectando extractos de tejidos preparados según las reivindicaciones 3^a, 4^a y 5^a, a animales, y extrayendo de estos animales, pasados de seis a ocho dias preferentemente, sangre, de la cual es extraído el suero según los métodos habituales.

20 7^a.--PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN EXTRACTO DE TEJIDO Y DE UN SUERO ESTIMULADO MEDIANTE ESTE EXTRACTO.--

25 Según se describe en la presente memoria que consta de doce hojas escritas a máquina.

Madrid, 17 de Enero de 1.952

-FRANCISCO JAVIER PLAZA-