

204067

204067



MEMORIA DESCRIPTIVA
que se acompaña a la solicitud de una
P A T E N T E DE I N V E N C I O N
por VEINTE AÑOS en ESPAÑA a favor de
Don André Jean Pierre Joseph THOMAS,
de nacionalidad francesa, domiciliado
en PARIS.- FRANCIA.

s o b r e

" PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION MASIVA
Y TRATAMIENTO DE VIRUS PATOGENOS Y
SUBSTANCIAS QUE LOS ACOMPAÑAN ".-

204067



5 El principio de la preparación de vacunas específicas contra las enfermedades de virus filtrantes o ultra virus del hombre y de los animales, hace necesaria la producción masiva. Ahora bien, como estos tan solo se cultivan en presencia de células vivientes, nos esforzaremos en obtener su cultivo, mas o menos abundante, de diversas formas :

- cultivo in vivo, es decir en los animales ;

10 - cultivo en vitro, es decir en los medios de cultivo artificiales o naturales, debidamente preparados, conteniendo células vivientes o sobreviviendo que a su vez se cultivan y en las que los virus se multiplican ;

- cultivo in ovo, es decir en embriones de pollos desarrollándose en el huevo ;

15 - o bien aún, cultivo de los órganos o en los grandes fetos que se hacen sobrevivir por inoculación artificial.

20 Pero estos medios presentan, en general, un rendimiento bastante limitado y en determinados casos insuficiente. Los métodos de cultivo in vitro y in ovo, principalmente, además de que pueden suministrar virus acompañados de proteínas extranjeras a la especie a las que se las destina y debido a ello ser mas o menos peligrosos, presentan sobre todo el defecto grave de provocar variaciones de las propiedades específicas de los virus, haciéndoles inutilizables en la mayoría de los casos.

25 Un ejemplo de virus que se intenta producir en gran cantidad es, el de la fiebre aftosa.

30 En este caso particular, es generalmente a partir de los aftas que se producen en la lengua y las mucosas de la garganta que se recoge el virus destinado a la fabricación de la vacuna anti-aftosa, después triturado, adsorción en alumina y atenuación por el formol a temperatura conveniente. Pero una vaca infectada artificialmente, luego sacrificada para permitir una recolección total del virus, no suministra, por término medio, mas de 40 a 70 grs. de virus; para que la recolección sea ligeramente mas abundante, es

35

204067



40

45

50

55

60

65

70

necesario sacrificar los animales especialmente seleccionados. El precio de coste del virus destinado a la producción de la vacuna es pues elevado. Además, el virus se obtiene con frecuencia en cantidad insuficiente. Por otra parte se trata de un producto virulento manchado de diversos microbios. Es principalmente por estas razones que se ha intentado obtener el cultivo masivo del virus aftoso. Se han utilizado entonces otras fuentes procedentes de la especie bovina : sangre, saliva en la que se excita la secreción mediante drogas, cultivo in vivo del virus aftoso asociado a otro virus (virus de la vacuna), lo que proporciona una pulpa de dos virus mezclados, etc...

Se han practicado tambien otros cultivos in vivo en diversas especies de animales : porcino, ovejuno, roederos de laboratorio, preparando a veces especialmente el animal; inoculación concomitante de un virus de otra suerte, producción de una edema-reaccional por sustancias irritantes o una infección, inoculación en los tejidos de un cancer injertado en el conejo de indias, en el pulmón del conejo modificado por otra infección o por otros trastornos circulatorios provocados, o diversas reacciones, etc... Pero en todas estas tentativas de cultivo in vivo, el rendimiento en virus obtenido es bastante reducido, variable y aleatorio ; además, en las diversas especies bovinas, el virus aftoso está sometido a modificaciones poco deseables con respecto a la preparación de vacunas para los bívinos.

Se ha intentado igualmente obtener la producción masiva del virus aftoso por el cultivo in vitro, o sea el cultivo en despojos de la mucosa de la lengua de bovinos adultos después de haberse desinfectado, en un medio de cultivo principalmente artificial, o sea el cultivo en pequeños fragmentos de piel de fetos de vaca en un medio natural, teniendo el valor de una dialisis, liquido defalo-raquideo o liquido amniotico de vaca.

Estos dos procedimientos permiten obtener el cultivo del



204067

virus aftoso en cantidades bastante importantes; se puede no obstante temer que la multiplicación del virus fuera del organismo no tenga una influencia molesta para sus propiedades, mas tarde o temprano.

75

Es debido a todos los incóvenientes y dificultades indicadas mas arriba que la fuente principal del virus aftoso destinado a la fabricación de la vacuna anti-aftosa en los diversos paises, está especialmente representada por los aftas obtenidos como consecuencia de inoculaciones de virus aftoso en la mucosa lingual de la vaca. Es a partir de la fuente principal representada por los aftas y algunas otras fuentes, que la vacuna anti-aftosa se prepara por adsorción en alumina y atenuación por el formol y el calor, o por otros antisépticos, o por agentes físicos, como los rayos ultravioletas, etc... Pero esta vacuna líquida no puede desecarse, pudiéndose tan solo conservar a temperatura baja, a algunos grados centigrados, si se desea mantener sus propiedades.

80

85

90

Ya que la recolección de los aftas está forzosamente limitada, se intenta sobre todo, preparar una vacuna antiséptica utilizando la menor cantidad posible de materia virulenta, por ejemplo añadiendo al virus ciertas substancias, como son las protaminas u otras. Pero esta economía de materia virulenta no resuelve el problema de la producción masiva de los virus.

95

100

No existe actualmente un procedimiento de producción en gran cantidad del virus aftoso, en la especie sensible a la que la vacuna anti-aftosa se destina especialmente, es decir a la especie bovina ; un tal procedimiento de cultivo masivo in vivo debe naturalmente conservar al virus aftoso toda su virulencia y propiedades específicas y todas las calidades necesarias para la producción de una vacuna eficaz, permitiendo incluso preparar una vacuna pudiéndose conservar en estado seco. Téngase en cuenta que, todo cuanto queda dicho concerniente al virus patógeno aftoso puede

105



204067

igualmente aplicarse a otros virus patogénicos para el hombre y para los animales.

110 El procedimiento según el invento permite obtener estos virus específicos muy virulentos en gran cantidad, por diversos kilos, con las sustancias que los acompañan y permite también atenuar o suprimir su poder patogénico, preparándoles luego al estado seco si fuera necesario.

115 Queda bien entendido que este procedimiento es general y aplicable a virus diversos de los animales y del hombre.

120 Este procedimiento consiste en provocar en el animal receptivo el desarrollo en gran masa del tejido en donde el virus que se desea cultivar se multiplica electivamente, luego a infectar el animal con el virus, ya sea por inoculación en esta masa de tejimientos electivos neoformada o en otra región, ya sea por contagio, luego a extraer la masa virulenta en el momento oportuno y tratarla convenientemente. Numerosos virus filtrantes, en efecto, no se multiplican abundantemente y tan solo conservan su caracter en las células de sus tejidos de elección : tejidos epitelios, nerviosos, etc.. Puede existir una electividad estricta para ciertos tejidos y no para otros. Además, ciertos tejidos electivos favorecen mas que otros la producción de sustancias asegurando los mecanismos de la inmunición. El procedimiento utiliza precisamente esta electividad de tejimientos de numerosos virus y en lugar de provocar solamente una masa reaccional cualquiera e indeterminada en el animal receptivo para intentar aumentar la recolección del virus inoculado, como hacen algunos hombres de laboratorio, crea las propias condiciones del medio de tejimiento específico exigido por el virus para su multiplicación abundante y para la conservación de sus características.

135 De una manera general, los tejidos de electividad del virus considerado se extraen asepticamente de los fetos e incluso del adulto de la misma especie, o eventualmente de otra especie mas o menos similar y también receptiva. Estos

140



204067

145

150

155

160

165

170

175

tejidos se cortan convenientemente y se diluyen, luego la suspensión de tejimientos así preparada se implanta en el animal sensible y en un sitio apropiado debajo de la piel, en la cavidad abdominal, pleural, etc.. Esta suspensión de tejidos específicos se organiza rápidamente en una masa neoforma, provocando reacciones importantes de la parte del huésped. Se constituye así lo que podríamos llamar un embrioma específico, constituido solamente por tejidos normales de elección del virus: por ejemplo tejidos epitelios, y, entre los mismos estos de un determinado órgano y no del otro, cuando las afinidades del virus que se desea cultivar son muy parecidas. En el momento preciso, transcurridos unos días, el virus se inocula en el animal, ya sea por vía electiva, ya sea o al propio tiempo en esta masa, que puede aumentarse enormemente de un peso de varios kilos en los grandes animales de matadero, como la vaca, por ejemplo. El virus se encuentra directamente en su medio de tejimientos de elección, tejido que a su vez está en pleno cultivo, de suerte que el virus se multiplica muy activamente conservando e incluso aumentando su virulencia. Además, determinadas sustancias químicas pueden añadirse al líquido de dilución del virus, con objeto de aumentar su virulencia, facilitando su cultivo y desarrollo de productos útiles para la inmunización. Puede incluso añadirse agentes biológicos, como determinadas bacterias convenientemente escogidas. Estas sustancias o agentes favorables, pueden igualmente añadirse a la suspensión de tejimientos de implantación. En el caso de que fuera indicado, el animal infectado se coloca en un recinto a temperatura conveniente, por ejemplo fresca.

Esta masa virulenta se extrae fácilmente transcurrido un tiempo determinado, representando una recolección de virus que puede corresponder, para un solo animal, a la que se obtendría normalmente, en los propios tejidos electivos, decenas e incluso centenas de los mismos animales. La mate-

204067



180

ria virulenta así obtenida muy fácilmente en pocos días, con todas sus calidades y todas las substancias que la acompañan y con una abundancia nunca alcanzada hasta ahora, se trata entonces convenientemente a fin de transformarse en vacuna por ejemplo, o en masa de inyección en el animal para la obtención de un anti-suero. Puede utilizarse tal cual una vez triturada convenientemente, o bien puede extraerse el virus por diversos medios físico-químicos; finalmente la masa virulenta es adsorbida, si fuera indicado, en substancias apropiadas, luego su virulencia se atenúa por diversos agentes físicos, químicos o biológicos.

185

El procedimiento según el invento reside más en el cultivo de los virus, in vivo, en embrioma específico, con preparación y atenuación conveniente de la masa virulenta, comprendiendo, si fuera indicado, su desecación por sublimación en el vacío a baja temperatura o liofilización. No obstante, en determinados casos, la atenuación puede dejar de ser necesaria.

190

A fin de describir el procedimiento según el invento, con mayor detalle, tomaremos como ejemplo la preparación del virus de la fiebre aftosa, pero este procedimiento puede aplicarse igualmente bien con variantes apropiadas, para la producción masiva y preparación de diversos virus patógenos de los animales y del hombre.

195

Los tiempos esenciales son: la preparación y la implantación de la suspensión de tejimientos específicos, la inoculación del virus, la recolección y la preparación de la materia virulenta.

200

La suspensión del tejimiento está esencialmente constituida por los tejidos epitelios de igual especie, extraídos asepticamente de los fetos de vacas sacrificadas, por ejemplo, en los grandes mataderos. Los uterinos llenos, obtenidos sin precauciones especiales se lavan, secan, luego desinfectan convenientemente mediante la tintura de yodo por ejemplo. Seguidamente se abren asepticamente y se retiran los fetos.

205

210



204067

215

220

225

230

235

240

245

Toda la piel de los fetos de dimensión conveniente aún sin pelos, las mucosas de la garganta, la lengua, se extraen. Se pueden añadir los pulmones, los testiculos, cordones umbilicales y si se quiere los órganos de los fetos de gran talla, incluso poco tiempo antes del término. Todos estos órganos se cortan en fragmentos lavándose luego en un liquido fisiológico conveniente con objeto de limpiarles lo mejor posible la sangre. Los pulmones, especialmente, no deben retirarse antes de someter a los grandes fetos a un sangrado y si fuera necesario haberles aplicado una corriente de liquido fisiológico a través de sus vasos para expulsar toda la sangre. Los pulmones y otros órganos de los animales jóvenes y adultos pueden utilizarse, pero las precauciones de la eliminación de la sangre y la asepsia son mas difíciles.

Si se utilizan órganos del adulto que están naturalmente manchados, como la mucosa de la lengua, la mucosa del rumen, etc... y que constituyen buenos medios de cultivo, es conveniente prepararlos y desinfectarlos con antisépticos, substancias antibacterianas como los antibióticos, etc.... Estos órganos pueden almacenarse durante algún tiempo en lugar frio, antes de utilizarse. Los fragmentos de órganos se pasan asepticamente por un cortador de carne que los reduce en pulpa fina. Esta se diluye convenientemente, por ejemplo de mitad, con un liquido fisiológico apirógeno y estable, provisto de un sistema tampón y de pH conveniente, por ejemplo pH 8,2, de suerte que la suspensión del tejido que ya es de por si ácida pasa a un pH situado cerca de pH 6,5.

A esta suspensión así preparada asepticamente, puede añadirse a dosis convenientes, productos antibacterianos como los llamados antibioticos, por ejemplo.

Se inyecta luego esta suspensión en la vaca, animal sensible en el ejemplo escogido. La implantación de la



204067

250

suspensión de tejimientos se hace asepticamente, ya sea debajo de la piel que puede haberse previamente afeitado y suficientemente despegado por insuflación de aire esterilizado, o en cavidad abdominal, por inyección intraperitoneal. Las vacas sanas, soportan sin ningún inconveniente ni trastornos estas implantaciones asepticas de varios litros. Es posible implantar tambien una suspensión procedente de tejidos de la especie bovina en un huésped de especie sensible, pero distinto, por ejemplo el cerdo.

255

La infección por el virus se efectua unos dias mas tarde de la implantación, por ejemplo tres o cuatro. En este momento el embrioma especifico se ha organizado, las celulas alteradas están en via de eliminación, las otras se multiplican, el pH es el del medio interior de la vaca. La dosis conveniente de virus previamente graduado se diluye en una cantidad apropiada de liquido fisiológico tamponado e inoculado en el propio embrioma, debajo de la piel, en diversos puntos, o en la cavidad abdominal. Al propio tiempo, la vaca puede recibir una inoculación virulenta en la mucosa de la lengua, que es el procedimiento clásico de transmisión experimental de la fiebre aftosa en este animal, o infectarse por otra via o por contagio, a partir de un animal habiendo ya contraído la enfermedad.

260

265

270

Según los casos, la inoculación por un procedimiento clásico o la transmisión de la enfermedad por contagio natural, puede evitar la inoculación en la masa del embrioma.

Esta inoculación virulenta en la mucosa de la lengua permite seguir muy facilmente la evolución en la vaca y recoger el embrioma virulento en el momento favorable.

275

280

Es además posible aumentar la virulencia del virus, adicionándole, según el invento, ciertas substancias del tipo de las polisacarias que forman parte del metabolismo normal y que se encuentran en abundancia en tejidos como la epidermis, las mucosas, los cartilagos, los tejidos de secreción de mucinas, etc... : ácido hialuronico y sus esteres



204067

9 JU

285

290

295

300

305

310

315

sulfuricos, como los llamados codroitina sulfúrica, mucic-
tina sulfúrica y los cuerpos derivados de estos. Es así que
extractos apropiados de estos tejidos y simplemente la he-
parina que puede fácilmente adquirirse ahora y que es una
substancia rica en esteres sulfúricos (mucocitina sulfúrica)
aumenta notablemente, a debil dosis, el cultivo y virulen-
cia. Igualmente puede emplearse mucinas cuyo grupo prosté-
tico es también el ácido mucocitina sulfúrico. Los extractos
convenientemente o la heparina, o mucinas, pueden añadirse sim-
plemente al líquido de dilución del virus en el momento de
la inoculación, o bien inyectarse en el embrioma específico,
antes o después. Se puede también asociar al virus en el lí-
quido de dilución o inyectar en el embrioma otras substancias
o agentes biológicos susceptibles de favorecer ya sea el cul-
tivo del virus, ya sea el desarrollo de la substancia favo-
rizando ulteriormente los mecanismos y la inmunización con-
tra la infección provocada por el virus, en particular cier-
tos microbios convenientemente escogidos, aislados o no de
los tejidos de los aftas que se desarrollan en la lengua de
los animales atacados de fiebre aftosa y pudiendo incluso
contener un cierto grado de necrobiosa.

La enfermedad se desarrolla y toda la masa del embrioma
específico sirve de medio de cultivo extremadamente favora-
ble al virus aftoso. Esta masa se extrae asepticamente en el
momento determinado por la evolución de la enfermedad, se-
gún los aftas, la curva térmica y la finalidad a alcanzar,
pudiéndose hacer extracciones tardivas cuando la virulencia
se ha reducido ya por las reacciones de defensa del organis-
mo.

La vaca así preparada da una recolección de materia vi-
ralenta en general superior a la cantidad de suspensión de
tejimiento que se le ha inyectado. La implantación provoca,
en efecto, una reacción de los tejidos del animal y una se-
creción abundante de serosidad. Es así que debajo de la piel
el embrioma específico determina una edema muy voluminosa :



204067

320

en el peritonio provoca la secreción de diversos litros de ascito, etc.. Todo este material es extraordinariamente virulento e interesa extraerlo manchándolo lo menos posible de sangre. Se puede recolectar por ejemplo, muy fácilmente, en pocos días 5 kilos o más de materia muy virulenta, en una sola vaca, comunicando esta materia la enfermedad por inoculación a otras vacas, en la dilución de 10^{-8} por ejemplo, lo que corresponde a una cantidad formidable de virus.

325

Los tejidos virulentos que se han extraído se preparan entonces convenientemente, asepticamente. Se verifican y seccionan, las grasas, los tejidos fibrosos o sangrientos se eliminan. Los fragmentos se reducen a pasta, luego se trituran lo más posible, es decir hasta conseguir la trituración de las propias células que los constituyen. Para esta operación que se efectúa a baja temperatura, diversos trituradores-emulsionadoras muy rápidos y homogenizadores, pueden utilizarse asociando o no una acción de la congelación y de la descongelación, que puede hacer estallar las células con la acción de los ultra-sones u otras acciones más. Finalmente, el triturado celular se mezcla con los líquidos virulentos recogidos en el propio animal a la vez que los tejidos virulentos recogidos: líquido de edema, líquido de ascito, etc. filtrándose el todo a través de una gasa o ligeramente centrifugado para eliminar los restos fibrosos si existieran; obteniéndose entonces el triturado virulento bruto de pH un poco alcalino (pH 8,3 por ejemplo). Este triturado se trata luego convenientemente según la finalidad deseada. Puede utilizarse tal cual o bien servir de materia de extracción para las fracciones separadas.

330

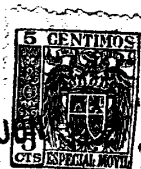
335

340

345

350

Todas las operaciones se efectúan asepticamente y a baja temperatura. Se puede extraer principalmente la fracción desoxiribonucleo-proteico por la acción del cloro de sodium concentrado (la concentración molecular o dos veces molecular, y precipitación en agua destilada) y la fracción ribonucleo-proteico por acidificación. Las nucleoproteinas



204067

totales (desoxiribonucleoproteínas y ribonucleoproteínas) asociadas a otras proteínas pueden precipitarse también con una solución de cloruro de cerium o de lantano, este-
relizado por filtración y diluido convenientemente.

355 La fracción de las globulinas (especialmente las globu-
linas) puede precipitarse por adición en frío de alcohol
etilico a 50° hasta 25°. La precipitación de la totalidad
de las proteínas puede hacerse por una mezcla de alcohol a
360 96° y dioxana pura por ejemplo, en partes iguales, en la
proporción de tres partes de esta mezcla para una de tritu-
rado bruto por ejemplo. La precipitación por acetona o sul-
fato de amonio u otros cuerpos puede hacerse igualmente,
pero es difícilmente completa; además, la dilución tiende
a provocar una disociación perjudicial de complejos protei-
cos.

365 Naturalmente, pueden emplearse otros procedimientos
de extracción de diversas fracciones. Las diversas fraccio-
nes pueden conservarse luego por desecación a baja tempera-
tura (liofilización).

370 El triturado bruto concentrado o diluido en un líquido
fisiológico tamponado de pH convenientemente o las fraccio-
nes activas que se han extraído, pueden luego prepararse
según la finalidad deseada. Se puede por ejemplo, adsorber-
las en un cuerpo adsorbente atenuando su virulencia, luego
375 liofilizarlas.

380 La adsorción si es interesante efectuarla, según la
finalidad deseada, puede practicarse según el método clási-
co, en hielo de alumina. Pero puede obtenerse igualmente
una buena adsorción mezclando convenientemente el tritura-
do virulento o los extractos del mismo, con preparaciones
compuestas de goma arábiga u otras gomas solubles en el agua,
engrudos de almidón, o de glicógeno, u otros glucidos, el
todo a un pH conveniente, por ejemplo ligeramente alcalino,
por un sistema también de glicocola y de sosa. Las cantidades
385 respectivas de estos diversos cuerpos pueden variar según



204067

390

las necesidades. Bien entendido, otras preparaciones adsorbentes pueden utilizarse, polivinilpirolidona u otras sustancias orgánicas o minerales, o biológicas, etc... o bien aún preparaciones de goma arábiga con un sistema también como el precedentemente descrito, al que se añade una débil cantidad de solución alcohólica de goma de almáciga : se produce un floculato muy homogéneo que puede desecarse bajo forma de fragmentos que no se adhieren al cristal y que pueden disolverse rápidamente en el agua. Todas estas preparaciones son naturalmente asepticas.

395

No obstante, en el triturado bruto, existen además de las nucleoproteínas virulentas, una cantidad importante de proteínas y otros cuerpos en asociación o no con el virus. Estos cuerpos tienen una gran importancia con respecto al desarrollo de los mecanismos de inmunización. Este conjunto, no disociado, constituye por sí mismo, con relación al virus, un complejo de adsorbente natural, pudiendo existir interés en respetarlo en su integridad.

400

405

La atenuación de la materia virulenta, o sea no disociada en estado de complejo natural, o de sus diversas fracciones, puede hacerse según los métodos clásicos, por la acción de diversos antisépticos a dosis, duración y temperatura convenientes, por ejemplo por la acción de agentes físicos, solos, temperatura, irradiación ultra-violeta, etc...

410

Pero otros procedimientos son, según el invento, aplicables; es así que la dioxana pura, o las mezclas de alcohol etílico y dioxana pura, de las que ya se ha hablado, pueden, en condiciones convenientes, atenuar suficientemente la virulencia, en triturados virulentos o triturados de aftas, si se dirige a esta fuente clásica de virus aftoso, sin dejar de tenerse en cuenta las propiedades inmunizantes. De igual manera, ciertas sustancias químicas que existen en los organismos, como resultado del proceso de desgradaciones enzimáticas, son de un gran interés para la atenuación de los virus. Es así que los polisacáridos que existen nor-

415

420

204067



425

430

435

440

445

450

455

malmente en abundancia en determinados tejidos y en particular en la piel y de los que algunos activan la virulencia y cultivo del virus, pueden liberar como productos de des-
gruadación, bajo la acción de ciertas enzimas, como las
enzimas mucolíticas u otras, o por hidrólisis, sustancias
que inactivan o neutralizan la materia virulenta. Este es
el caso por ejemplo del ácido d-glicurónico o de algunos de
sus derivados (d-glucuronos por ejemplo) y de la glucosamina
o de sus derivados : N-acetil-d-glucosamina o simplemente
del cloridrato de glucosamina por ejemplo o del ácido galac-
turónico, cuerpo practicamente no tóxico en el empleo que se
destina. Basta pues con añadir estos cuerpos, especialmente
el cloridrato de glucosamina, en la materia virulenta, a una
concentración, duración y temperatura convenientes, para
atenuar o neutralizar suficientemente. Tales cuerpos como
la glucosamina o sus derivados, o la d-glucorona, o el áci-
do d-glicurónico, u otros cuerpos vecinos o derivados, pue-
den añadirse de manera conveniente en las preparaciones de
materia virulenta y adsorbente, de la que ya se ha hablado
y atenuar suficientemente la virulencia. Estos cuerpos que
pertenecen al metabolismo del organismo pueden atenuar tam-
bien de manera análoga en otras fuentes de materia virulen-
ta, por ejemplo los aftas que se utilizan clasicamente como
fuente de virus aftoso. Téngase en cuenta que las gomas, y
especialmente la goma arabiga, que se emplean en estas pre-
paraciones contienen diversos glucidos, principalmente los
pectosos y un ácido urónico, el ácido glicurónico y pueden
contribuir, en determinadas condiciones a atenuar la viru-
lencia. Además, preparaciones convenientes de estos cuerpos
químicos biológicos que atenúan o neutralizan el virus y
los absorbentes, de los que ya se ha hablado, u otros ad-
sorbentes inyectables, constituyen preparaciones-retardado-
ras lentamente reabsorbidas y pudiendo provocar reacciones
favorables en la estabilización de la inmunidad. En fin,
la virulencia puede atenuarse por los mecanismos biológicos



204067

de defensa del organismo en caso de extracciones tardias de la masa de tejimiento.

460 La materia virulenta limpia de bacterias de infección banal, obtenida por kilos en pocos dias, preparada, adsorbida o no, atenuada en la forma indicada, puede entonces conservarse, ya sea en el estado liquido, en solución, ya sea desecada por sublimación en el vacio a baja temperatura, por liofilización. Puede entonces prepararse en polvo o en comprimidos y conservarla por ejemplo en tubos sellados, en el vacio o en el azoe.

465 La materia virulenta obtenida puede igualmente utilizarse después de haberse atenuado mas o menos, como masa de inyección en el animal a fin de producir en este, en la sangre y otros liquidos, substancias especificas o anticuerpos. Tales sueros conteniendo anticuerpos o anti-sueros se destinan para la protección temporal de otros animales contra la enfermedad provocada por el virus.

470 Bien entendido, la invención no está limitada por los detalles de realización del procedimiento descrito precedentemente, tomando como ejemplo particular el de la fiebre aftosa. Podrian modificarse o bien dejarse de utilizar todos sin salirse del cuadro de la presente invención y que se aplica a la producción masiva y al tratamiento de diversas materias virulentas.

480 Se escogerán los tejidos a implantar teniendo en cuenta las afinidades particulares del virus que se desee producir y se inyectará si fuera necesario, substancias favorizantes, distintas según los casos, por ejemplo, para ciertos virus difusibles, la colina, la guanidina, etc...

485 N O T A

En resumen : la PATENTE DE INVENCION, cuyo registro se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones siguientes :

490 1º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y substancias que los acompañan, caracterizado por el hecho de que se provoca en un animal receptivo



204067

495

el desarrollo en masas importantes de tejidos en donde el virus que se desea producir se multiplica electivamente, luego en el momento oportuno la infección virulenta se transmite al animal por inoculación o contagio y la masa de tejido que se encuentra virulenta se extrae, tratándose seguidamente esta masa según la finalidad deseada.

500

2º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que los tejidos en los que el virus se multiplica de manera electiva se extraen asepticamente del feto o del adulto de un animal de la misma especie o de una especie receptiva mas o menos próxima del animal receptivo en el que debe desarrollarse la masa importante de tejidos.

505

3º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que los tejidos procedentes de un feto o de un adulto se fraccionan, diluyen y adicionan de antibioticos, luego la suspensión de tejimientos obtenida se aplica en un animal receptivo en el lugar apropiado del mismo, en el caso de la fiebre aftosa por ejemplo, la implantación se hace principalmente debajo de la piel o en la cavidad peritoneal.

510

515

4º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 3, caracterizado por el hecho de que después de la implantación del tratamiento del tejimiento en el animal receptivo se deja transcurrir un tiempo suficiente para que los fragmentos de los tejidos puedan organizarse en una masa de neoformación acompañada de los productos de reacción del organismo del animal, luego el virus se inocular en el animal dejándose en lugar el mas indicado para el mejor desarrollo de la infección.

520

525

5º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según



204067

las reivindicaciones 1, 3 y 4, caracterizado por el hecho de que la inoculación se hace en el conjunto de las neoformaciones.

530

6°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el animal recibe una inoculación virulenta por un procedimiento clásico para la infección considerada o bien se infecta por contágio, esta inoculación o bien esta infección se acompaña o no de una inoculación en el conjunto de las neoformaciones.

535

540

7°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que los fragmentos de tejidos extraídos en el feto o en el adulto de la misma especie se reducen a pulpa fina, diluyéndose si fuera necesario en un líquido provisto de un sistema tampón y cuyo pH es superior a 7 con objeto de reducir la acidez de la suspensión que debe implantarse en el animal receptivo, implantando así una suspensión cuyo pH es vecino de la neutralidad.

545

550

8°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado por el hecho de que las sustancias químicas, por ejemplo las sustancias del tipo de determinadas polisacaridas de tejimientos: ácido hialorónico o sus esteres sulfúricos o cuerpos derivados de los mismos o extractos conteniendolos, se añaden al líquido de dilución del virus para aumentar su virulencia o favorecer su cultivo o el desarrollo de sustancias útiles a la inmunización.

555

560

9°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado por el hecho de que la sustancia química añadida al líquido de dilución del virus para exaltar su virulencia o favorecer su cultivo



204067

o el desarrollo de sustancias útiles a la inmunización, es la heparina utilizada a pequeñas dosis o aún la micina.

565 10º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado por el hecho de que las sustancias o agentes biológicos favoreciendo el cultivo del virus, o bien favoreciendo el desarrollo de sustancias aumentando la acción de los mecanismos de la
570 inmunización contra la enfermedad provocada por el virus, están asociadas ya sea a la sustancia del tejimiento de implantación, ya sea al líquido del virus inyectado en el animal portador de la masa de tejimiento implantada.

575 11º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la masa de tejido desarrollada en el animal y en la que el virus se ha multiplicado, se separa del animal transcurrido un tiempo determinado, se la fragmenta y se retiran eventualmente de esta masa los tejidos no deseables, sometien-
580 dosela seguidamente a un triturado, hasta destrucción de las células, de preferencia a bajas temperaturas.

585 12º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el triturado obtenido se mezcla al líquido virulento recogido durante la separación de la masa virulenta del animal.

590 13º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de que la mezcla virulenta puede utilizarse tal cual, pudiéndose extraerse algunas de sus fracciones.

595 14º.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de

204067



que la fracción de las nucleoproteínas se extrae por tratamiento al cloruro de sodium concentrado y precipitación por agua, o por acidificación, o por precipitación por el cloruro de cerium o el cloruro de lantano.

600

15°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1,12, caracterizado por el hecho de que la fracción de las globulinas se precipita por adición en frío de alcohol a 50° hasta una graduación de 25° aproximadamente.

605

16°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de que la totalidad de las proteínas se precipita por una mezcla en partes iguales de alcohol a 96° y dioxana pura por ejemplo en la proporción de tres partes de mezcla de alcohol y dioxana para una parte de triturado.

610

17°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de que la mezcla virulenta o las fracciones activas derivadas de las mismas se adsorben por preparaciones comprendiendo una o dos gomas solubles en el agua especialmente la goma arabiga, engrudo de almidón o bien aún glicógeno u otro glucido.

615

620

18°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de que la adsorción de las fracciones activas de la mezcla virulenta se realiza por preparaciones de goma arabiga asociada o no a otras sustancias a las que se añade una debil cantidad de solución alcoholica de goma de almacilla.

625

19°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según las reivindicaciones 1 y 12, caracterizado por el hecho de

630

204067



que la adsorción de las partes activas de la mezcla virulenta se realiza por preparaciones de polivinilpirolidones u otras sustancias o sustancia orgánica o mineral o biológica.

635

20°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la materia virulenta se inactiva o neutraliza mediante productos de desgradación obtenidos por la acción de enzimas tales como enzimas mucolíticas o por acción de una hidrólisis en las polisacarides existiendo normalmente en determinados tejidos.

640

645

21°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el producto utilizado para inactivar o neutralizar la materia virulenta es el ácido d-glicurónico o algunos de sus derivados o determinadas sustancias procedentes de los mismos o muy similares, el d-glucurona y el d-glucosamina o sus derivados o las sustancias que contienen estos cuerpos.

650

655

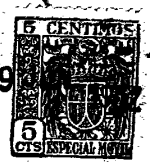
22°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la materia virulenta se atenúa mediante dioxana mezclada eventualmente con alcohol etílico.

660

23°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la materia virulenta obtenida se transforma en vacuna por un procedimiento corriente existiendo la utilización de productos adsorbentes o no, y atenuación artificial o no de la virulencia.

665

24°.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y sustancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la



204067

670

materia virulenta obtenida, más o menos atenuada, se inyecta en el animal, con objeto de producir en la sangre y los otros líquidos de éste, el desarrollo de substancias específicas o anticuerpos pudiendo proteger por si mismos otros animales contra la enfermedad provocada por el virus.

675

250.- Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y substancias que los acompañan, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la masa virulenta obtenida, transformada o no en vacuna se deseca por ejemplo por sublimación en el vacío a baja temperatura. Lo mismo ocurre con sus extractos.

680

260.- La propiedad y la explotación exclusiva del objeto de la patente, sean cuales fueren las circunstancias que concurren con su esencialidad definida en las anteriores reivindicaciones, cual objeto es:

"Procedimiento de producción masiva y tratamiento de virus patógenos y substancias que los acompañan".

Consta la presente memoria descriptiva de veintiuna hojas foliadas, escritas por una sola cara.

Barcelona, 9 de Junio de 1952.

P. p. de Don André Jean Pierre Joseph THOMAS,