

227796

P - 14.493

Rehecha I

227796



MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de WILLIAM E. PETERSON y BERRY CAMPBELL, de nacionalidad norteamericana, residente el 1º en 1447, Chelmsford, Street, St. Paul, y el 2º en 153 Orlin Avenue, S.E. Mineápolis, ambos en Minnesota, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UN PRINCIPIO PROTECTOR ESPECIFICO CONTRA UNA SUSTANCIA ANTIGENA"

El presente invento se refiere a la producción, en las glándulas mamarias de los ungulados, de un anticuerpo o principio protector muy específico contra una gran gama de antígenos. El invento se refiere igualmente al aislamiento y a la separación de un principio activo a partir de la leche, y a la utilización del principio protector en la prevención y el tratamiento de las enfermedades humanas y de los animales y en la



E 18

227796

preparación y purificación de sustancias biológicas, proteínas, antígenos, etc.

La importancia del calostro de las vacas como fuente de anticuerpos para las terneras recién nacidas se conoce desde hacía muchos años y ha sido muy estudiado. El trabajo que conduce al presente invento se ha orientado hacia la aplicación de estos fenómenos de base conocidos a un mayor terreno de utilización de lo que es posible en lo que podría denominarse los mecanismos naturales. En una primera investigación, se ha descubierto que el lugar de producción de los anticuerpos en la ubre de los bovinos se encuentra en las células protoplásmicas intersticiales. Se ha encontrado que estas células varían en número con la producción de anticuerpos. Se ha descubierto entonces que podría forzarse al animal a producir anticuerpos seleccionados por infusión en la ubre de especies particulares de micro-organismos (muertos o vivos) y por una alimentación similar de antígenos de proteína y de antígenos de tejido, normales o patológicos. Se ha descubierto que la cantidad de cuerpos inmunes específicos que resultan en la leche de los animales así tratados aumentaba por aplicaciones de refuerzo de los antígenos local y sistemáticamente.

Una aplicación práctica de la materia inmune en la prevención y tratamiento de las enfermedades humanas y de los animales se hizo posible por el descubrimiento de los inventores de que, ya sea la ingestión



227796

5 de leche que contiene esta materia, ya una perfusión en los intestinos, permitían la absorción de los cuerpos inmunes en la circulación o en el curso sanguíneo de los animales más viejos, lo mismo que en los recién nacidos y en los animales de una especie diferente de la de los donadores. Aplicaciones parenterales del anticuerpo o del principio protector se han realizado sobre animales de la misma especie que la del donador y sobre animales de especie diferente.

10 La fracción de la leche que lleva la materia immune puede separarse por centrifugación en condiciones de pH y de temperatura determinadas. La leche fortificada por anticuerpos procedentes de ungulados estimulados según el presente invento puede conservarse por
15 pasteurización o por desecación.

Un objeto principal del presente invento es crear un procedimiento que permite conducir a las glándulas mamarias de los ungulados, un anticuerpo o un principio protector muy específico contra una gran gama de
20 antígenos.

Otro fin principal del presente invento es procurar un procedimiento de aplicación de cuerpos inmunes procedentes de las glándulas mamarias de los ungulados, en medicina o en la crianza.

25 Otro objeto del presente invento es procurar, como compuesto nuevo, una leche de título elevado, rica en principio protector específico contra cual-



227796

quiera de una gran serie de antígenos o de combinaciones de antígenos.

5 Otro fin, todavía, del presente invento es procurar un procedimiento de aislamiento y de separación de anticuerpos o de principios protectores, de la leche procedente de las glándulas mamarias estimuladas de ungulados.

Otros fines del invento aparecerán por la descripción siguiente.

10 Para conseguir los fines anteriores y otros aparentes, el presente invento comprende las características que se describen más en detalle en lo que sigue y que se recogen en las reivindicaciones, dando la descripción siguiente ciertos detalles de formas de aplicación
15 no limitativas del invento, ya que los principios de éste pueden aplicarse de muchos otros modos.

Producción del principio protector.

20 Un anticuerpo muy específico en la leche de los ungulados (especialmente vacas, cabras, ovejas), se produce contra no importa qué antígeno introduciendo tal antígeno en la ubre del animal. Un anticuerpo específico en la leche se produce por la introducción del antígeno en los canales de los pezones del animal en un momento cualquiera. Sin embargo, la reacción de anticuerpos
25 más elevada se produce después de la introducción del antígeno durante el periodo de esterilidad del animal y especialmente después de una serie de introducciones,



227796

conocidos con el nombre de refuerzos, espaciadas en cierto periodo de tiempo.

5 Aun cuando las cantidades de antígeno introducido, la frecuencia (intervalo de tiempo) y el número de dosis de refuerzo pueden variar mucho, la reacción más elevada de anticuerpos resulta de la inyección de una serie de dosis de cantidades crecientes en la ubre de un animal en su periodo estéril, sobre una duración de varias semanas.

10 El volumen y la concentración de las dosis de antígeno no son críticos sino que se eligen según la comodidad. Se ha visto que el aumento o la disminución del volumen de la inyección de antígeno no produce un
15 aumento o una disminución del título del principio protector de la leche resaltante. La sustancia antigénica puede inyectarse en no importa qué momento, pero en el caso de una vaca que no dé leche es a menudo preferible en
20 gracia a la comodidad que el antígeno se introduzca hacia el final del periodo de gestación. Así, por ejemplo, las inyecciones iniciales pueden suministrarse de dos a
ocho semanas aproximadamente antes del parto.

25 Las inyecciones de refuerzo, cuando se administran, pueden igualmente espaciarse a la conveniencia del operador, salvo que las inyecciones debieran hacerse con suficiente frecuencia para que no se produzca una reacción antifiláctica. Para la mayoría de las especies, este tiempo es inferior a unos 10 a 14 días. Para



21 SEP 1958

227786

evitar una irritación y una congestión locales, se pre-
fiere usualmente que las inyecciones de refuerzo no se
administran con más frecuencia que cada día. Las sustan-
cias antígenos son puestas en suspensión en un medio lí-
quido, para la inyección, tal como, por ejemplo, una so-
lución salina fisiológica estéril. La inyección se rea-
liza en el sistema de canales de la ubre por el mosto de
los pezones y en el depósito glandular. Si se desea, pue-
de darse masaje a la ubre para obtener una mejor penetra-
ción del antígeno en el sistema de canales de ella.

Quando se administran inyecciones de anti-
geno a la vaca estéril, el principio protector está pre-
sente en la leche desde la aparición de ésta. Las inyec-
ciones de refuerzo se administran entonces por la vía in-
travenosa, intramuscular o subcutánea para mantener la
producción del principio protector en un grado elevado.

Para las vacas que dan leche, la inyec-
ción inicial y las inyecciones de refuerzo pueden hacer-
se directamente en la ubre. El principio protector apa-
rece en la leche unos dos días a dos semanas después de
la inyección inicial, variando un poco según el antígen-
o particular utilizado. Por ejemplo, se observó el es-
treptococo agaláctica en la leche el 10º día después de
la inoculación de una vaca que daba leche.

Las sustancias antigénicas que se utilizan
en la práctica del presente invento para la producción
de un principio protector son las bacterias, los virus,



227796

las proteínas, los mohos y hongos micóticos, los tejidos, los pélenes y sustancias similares que son antígenas.

Ejemplos de antígenos son para las bacterias: *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus pyogenes* 5 neumococos, estreptococos, etc.; para los virus: influenza tipo A, varicela, viruela, herpes simplex, etc.; para las proteínas: albúmina de huevo, tejidos de ratón, tejido em-
brionario del huevo, etc.; para los tejidos: sangre y es-
10 perma. Debe entenderse que estas materias son simplemente ejemplos del número y de las variedades casi infinitos de las sustancias antígenas contra las cuales pueden produ-
cirse en la ubre de los ungulados anticuerpos o princi-
pios protectores específicos. Las expresiones "sustancia
15 antígena" y "materia antígena" se utilizan para designar materias que son antígenas en sí mismas o igualmente ma-
terias no antígenas, pero que actúan como antígenas en pre-
sencia de auxiliares. Los organismos de enfermedades an-
tígenas están especialmente comprendidos en estas expre-
20 siones.

Ejemplo 1

El sujeto experimental era una vaca de Jersey, cinco semanas antes del parto. El antígeno era *Salmonella pullorum* muerto. La dosis inicial de antígeno 25 no se inyectó en el canal del pezón: un mol de antígeno por cuarto, conteniendo unos 5 billones de organismo. La primera dosis de refuerzo se inyectó una semana más



227796

tarde, a saber, un ml. de antígeno por cuarto, conteniendo unos 10 billones de organismos. Inyecciones siguientes de refuerzo de 1 ml. por cuarto, conteniendo concentraciones progresivamente mayores de la materia antigéna, respectivamente unos 20, 30 y 40 billones de organismos muertos, fueron hechas a intervalos de una semana. Después del parto la leche aglutinaba el antígeno a más de 100.000 diluciones.

El anticuerpo o principio protector en el cuerpo disminuía rápidamente después del parto, desde una aglutinación a más de 100.000 diluciones inmediatamente después del parto hasta una aglutinación a 1.000 diluciones solamente a las cuatro semanas. El nivel del principio protector puede elevarse y mantenerse por la administración sistemática de antígeno. Después del parto, pueden ser administradas dosis de refuerzo del antígeno por inyección parenteral de la materia antigéna, inyección intravenosa, intramuscular o similar. No pueden hacerse inyecciones de refuerzo posteriores al parto en los canales de los pezones sino que deben serlo por vía parenteral para evitar una reacción alérgica.

Ejemplo 2

El proceso del ejemplo 1 se repitió sobre otra vaca, con la única diferencia de que las dosis de antígeno inyectado, en la inyección inicial y en las inyecciones de refuerzo, eran de una concentración que no alcanzaba más que una décima parte de la utilizada en el



ción total en una dilución de 1/20.

Ejemplo 6

5 Se inyectó *stafilococcus aureus* en la ubre de una vaca lactante. La vaca no se ordeñó durante un día y luego el ordeño se realizó a intervalos regulares. La leche, 10 días después de la inyección, mostraba una algutinación total a una dilución de 1/10.

Ejemplo 7

10 Para mostrar la producción del principio protector contra una combinación específica de sustancias antígenas, se inyectó en la ubre de una vaca, dos semanas antes del parto, una mezcla en número casi iguales de neumococos tipo 1, neumococos tipo 2, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Staphylococcus albus*. Una mezcla
15 similar se le administró como refuerzo una semana más tarde. La leche después del parto mostró una fuerte reacción para el anticuerpo contra todas las especies inyectadas.

Ejemplo 8

20 Una dosis de 90 mgr. de un virus corriente de varicela en 3 mls. de agua fué inyectada en un cuarto de una vaca. El aumento del virus en el agua fué mostrado por una reacción 5 días más tarde.

Ejemplo 9

25 Para ilustrar todavía la administración de un virus, un ml. de herpes simplex corriente fué inyectado en un cuarto de una vaca y tuvo por resultado la producción de un principio protector antiviral.



227706

Ejemplo 10

2 mls. de clara de huevo se inyectaron en un cuarto de una vaca lactante. No hubo reacción en el momento de la administración y el ensayo de precipitación
5 fué negativo. Doce días más tarde, la leche mostraba una fuerte reacción de precipitación. Al día siguiente, una inyección de una cantidad suplementaria de 2 mls. de clara de huevo en el mismo cuarto produjo una violenta reacción alérgica.

10 Ejemplo 11

La producción de un principio protector en cabras se realizó administrando diariamente infusiones de un ml. de una suspensión de Salmonella Pullorum por los canales del pezón de una cabra grávida. Las infusiones
15 diarias se hicieron en un periodo de más de 4 meses antes del parto.

El anticuerpo o principio protector puede ser conservado en leche pasteurizada, leche condensada, leche desecada y en globulina gamma aislada de la leche.
20 Las temperaturas de pasteurización deben ser cuidadosamente controladas. Una pasteurización normal, (es decir, a 56°C durante 30 minutos) carece de efecto desventajoso sobre el principio protector. Es preciso tener cuidado de impedir el aumento de la temperatura durante un periodo de tiempo apreciable. Por ejemplo, cuando se efectua
25 una pasteurización a 68°C se ha encontrado que el principio protector en la leche cae a la mitad. El enfriamien-



227796

to de la leche pasteurizada debe ser rápido a fin de conservar el principio protector. La pasteurización puede realizarse por los métodos conocidos "flash" o "holding". La leche que contiene un principio protector puede condensarse bajo una regulación cuidadosa de la temperatura. La leche desecada que contiene el anticuerpo o el principio protector se prepara, con preferencia, a partir del producto no condensado. Sin embargo, la leche condensada puede utilizarse si se condensa primero cuidadosamente a bajas temperaturas para evitar la destrucción del principio protector. La desecación puede realizarse por los procedimientos de pulverización o sobre tambor en condiciones convenientemente controladas a fin de conservar el principio protector. Las altas temperaturas no son en sí mismas desventajosas para el principio protector salvo cuando se mantienen durante cierto periodo de minutos. Así es como la leche puede desecarse en un desecador en el cual se alcanzan temperaturas de 150 a 204°C, pero en el que la leche no está a estas temperaturas más que durante un instante.

Puede administrarse a la ubre por una operación de dos fases un virus proliferante. La primera inoculación se hace de la manera normal. La segunda inoculación se realiza entonces en la leche resultante de la primera, siendo retirados por dilución los antígenos de tejidos concomitantes.

Este proceso de tamizado se ilustra en lo



EL SEPT

227786

5 a -5°C en una cantidad igual a 25% en volumen. Esta mezcla reposó durante ocho horas y se centrifugó a -5°C . La fracción activa precipitada se concentró así y se retiró. Se disolvió con un pequeño volumen de agua a -5°C y se puso en un matraz de liofilización para liofilizarla en él a -79°C durante ocho horas. Así, la fracción activa se transformó en un polvo blanco y seco.

10 Es evidente que pueden hacerse numerosas modificaciones y variaciones del presente invento sin salirse de los límites de esta Patente. Las formas de realización particulares antes descritas se han dado solamente a título de ejemplos.

15 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los estados Unidos de América el 7 de Abril de 1955, bajo el N^o 500.038, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

=000= N O T A =000=

20 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente



227796

de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1º. - Un procedimiento de producción de un principio protector específico contra una sustancia antigéna, caracterizado porque se inyecta la materia antigéna en las glándulas mamarias de un animal angulado, se repite la inyección a intervalos espaciados de tiempo para aumentar la producción del principio protector y se ordeña luego al animal.

10 2º. - El procedimiento del punto 1, caracterizado porque la materia antigéna se elige de la clase que comprende las bacterias, los virus, las proteínas, los tejidos, los mohos y los hongos micóticós, los polenes y los polvos fecundantes.

15 3º. - El procedimiento del punto 1, caracterizado porque el animal es una vaca.

4º. - El procedimiento del punto 3, caracterizado porque la materia antigéna se inyecta en la vaca mientras está estéril.

20 5º. - El procedimiento del punto 4, caracterizado porque la materia antigéna se inyecta en la ubre de las vacas, unas dos a ocho semanas antes del parto.

25 6º. - El procedimiento del punto 5, caracterizado porque la inyección de la materia antigéna se repite una a ocho veces en dosis progresivamente mayores a intervalos espaciados de dos días a dos semanas aproximadamente.



31 SEP 6

227796

5 7º. - El procedimiento del punto 6, caracterizado porque la inyección de la materia antigéna antes del parto se realiza en el sistema de canales de la ubre por el canal del pezón y se administra por vía parenteral inyecciones de refuerzo después del parto para mantener el nivel elevado de producción del principio protector.

10 8º. - Un procedimiento de producción de un principio protector contra una combinación específica de sustancias antigéna, que comprende la inyección de esta combinación de materias antigéna en las glándulas mamarias de un animal ungulado y a continuación el ordeño del animal.

15 9º. - Un procedimiento de aislamiento de globulina gamma a partir de la leche, que comprende la separación de la leche para retirar la grasa, la precipitación y la retirada de la caseína, la regulación de la fuerza iónica a aproximadamente 0,40 a 0,45, el enfriamiento hasta aproximadamente menos 5º C y la adición de alcohol para precipitar la globulina gamma.

20 10.- El procedimiento del punto 9, caracterizado porque se acidifica la leche descremada para precipitar la caseína y se retira luego ésta, se añade, después de enfriamiento, alcohol hasta 25% en volumen aproximadamente, para precipitar la globulina gamma y se retira y se separa ésta.

25 11º. - Un procedimiento de producción de



22776 E1 SEP 1956

5 globulina gamma enriquecida con un principio protector específico contra una sustancia antigéna, caracterizado porque se inyecta la materia, se recupera la leche de este animal, se separa la leche para retirar la grasa, se precipita y se retira la caseína, se regula la fuerza iónica a aproximadamente 0,40 a 0,45, se enfría luego hasta unos menos 5°C y se añade alcohol para precipitar la globulina gamma.

10 12º. - El procedimiento del punto 11º, caracterizado porque la materia antigéna se inyecta en la ubre de una vaca, unas dos a ocho semanas antes del parto, y la inyección se repite a intervalos espaciados, la vaca es ordeñada después del parto, la leche es separada para retirar la grasa, y la leche descremada se acidifica para precipitar la caseína que es retirada entonces.

15

20 13º. - El procedimiento de la reivindicación 11º, caracterizado porque después de enfriamiento, el alcohol se añade hasta aproximadamente 25% en volumen para precipitar la globulina gamma y ésta se retira y separa a continuación.

25 14º. - Un procedimiento de introducción de un principio protector específico, contra una sustancia antigéna, en la circulación de la sangre de un animal, caracterizado porque se administra al animal el producto resultante de la inyección de la materia antigéna en las glándulas mamarias, de un animal ungulado y se le ordeña luego.



227796

15^a. - El procedimiento del punto 14, caracterizado porque el principio protector se administra por el aparato digestivo.

5 16^a. - El procedimiento de los puntos 14 ó 15, caracterizado porque el principio protector se administra por vía bucal.

10 17^a. - Un procedimiento de introducción de un principio protector específico contra una sustancia antígena, en la circulación de la sangre de un animal, que comprende la inyección en el animal de la globulina gamma.

15 18^a. - El procedimiento según los puntos 14 ó 17, caracterizado porque el animal receptor al cual se administra el principio protector es de una especie diferente de la del animal donador.

20 19^a. - Un procedimiento de enriquecimiento de la leche y de los productos lácteos, con un principio protector específico contra una sustancia antígena, que comprende la mezcla, con esta leche y estos productos lácteos, de una pequeña cantidad del producto resultante de la inyección de la materia antígena en las glándulas mamarias de un animal ungulado, y el ordeño inmediato de este último animal.

25 20^a. - El procedimiento de secar un miembro del grupo que consiste en leche y calostro cuyo miembro incluye anticuerpos específicos a un antígeno previamente seleccionado como resultado de la infusión de dicho



221796

antígeno en la ubre de un ungulado, comprendiendo dicho procedimiento la operación de inyectar dicho miembro a una temperatura no substancialmente en exceso de la temperatura ambiente en un secador de pulverizaciones.

5

21º. - El procedimiento que comprende la operación de infundir un antígeno previamente seleccionado en la ubre de un ungulado para la producción de anticuerpos específicos a dicho antígeno, separar después del citado ungulado un miembro del grupo que consiste en leche y calostro y preparar dicho miembro para su ingestión por un animal, incluyendo un ser humano.

10

22º. - El procedimiento que comprende las operaciones de infundir un alergeno en la ubre de un ungulado y subsiguientemente separar de dicho ungulado un miembro del grupo que consiste en leche y calostro.

15

23º. - El procedimiento que comprende las operaciones de infundir un antígeno en la ubre de un ungulado durante el periodo estéril de dicho ungulado, separar subsiguientemente de dicho ungulado un miembro del grupo que consiste en leche y calostro, repetir dicha infusión durante el periodo de lactancia de dicho ungulado cuando la producción de anticuerpos a dicho antígeno ha disminuido substancialmente.

20

24º. - Un procedimiento de producción de un principio protector específico contra una sustancia antigena.

25



227796

Tal y como se ha descrito en la Memoria
que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas
escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 1 SEP. 1956

P. A.
Alberto de Elzaburu
Por poder.
Alde