

mc/

Caso: 8634

285877

28F



285 877

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

a favor de

MERCK & CO., INC. - de nacionalidad norteamericana - do-
miciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln

Avenue,

por:

" Procedimiento para concentrar y purificar substancia
inhibidora de virus "

-----:oOo:-----

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Este invento se refiere a la concentración y pu-
rificación de una substancia inhibidora de virus o viros-

28 FEB



285877

tática, designada en adelante por VIS denominación formada por las iniciales de las palabras inglesas "viral inhibiting substance", y más concretamente a la concentración y purificación de la VIS procedente de líquidos alantoideos que la contengan.

5

El procedimiento del invento se puede emplear para concentrar y purificar VIS preparada cultivando un virus vivo en el alantoides de huevos empollados de gallina y recogido en los líquidos extraembrionarios del huevo.

10

Se ha descubierto, como particularidad de este invento, que la VIS preparada cultivando virus vivos en el alantoides de huevos empollados de gallina puede separarse a gran concentración del líquido alantoideo añadiendo primero un precipitante de proteína para eliminar los virus y las proteínas inactivas del líquido alantoideo cargado de VIS, y precipitando luego la VIS de la capa superior por tratamiento con una sal de metal pesado, a un pH entre 6-8 aproximadamente. Así se obtiene una concentración diez a veinte veces mayor de VIS, que puede servir en esta forma como agente de ensayo o como sustancia virostática para los fines que a continuación se exponen.

15

20

25

30

También se ha encontrado, como otra peculiaridad del invento, que puede conseguirse una purificación substancial de la VIS mediante cromatografía de la VIS concentrada así obtenida sobre una resina carboxílica de intercambio catiónico y eluyendo luego el material activo en forma progresiva continua, o mejor en forma escalonado, empleando un moderador acuoso de acetato o de fosfato como

28



23077

eluyente, lo cual da una concentración alrededor de 2000 veces mayor de VIS, con un factor de purificación 1700 veces mayor. Pueden aumentarse la purificación y la concentración precipitando de nuevo la VIS con una sal de metal pesado, según queda dicho.

5

Una porción grande de impureza residual que pueda seguir asociada a la VIS después de efectuar las precedentes operaciones puede retirarse por iontoforesis (apropiada para pequeñas cantidades, o para identificar impurezas residuales) o por electroforesis por zonas (especialmente adecuada para cantidades mayores de material muy concentrado y purificado que contenga VIS).

10

El líquido alantoideo cargado de VIS se prepara con preferencia empleando huevos empollados, mejor de gallina, incubados durante nueve a doce días. Los huevos se contaminan luego en el alantoides con virus vivos de gripe (influenza), mejor inyectando unas $10^{3,50}$ a $10^{5,50}$, y con preferencia $10^{4,50}$ dosis medias infecciosas de huevos (EID_{50}) de virus de gripe A, cepa WS, E 5372 (obtenible del Instituto Rockefeller, Nueva York 21, N.Y., o de Merck & CO., Inc., West Point, Pa), contenidos en 0,20 ml. de material inoculable. Pueden utilizarse otros virus vivos en vez de la cepa del de gripe mencionada, por ejemplo, otras cepas de virus vivos de gripe A, B o C, como la cepa PR^B de gripe A, la cepa Melbourne de virus de gripe A, y virus similares, o de sarampión, y sus análogos. Los huevos infectados se incuban luego durante 72 horas por lo menos, y mejor durante 96 y hasta 120 horas como máximo, a 36-37°C., y después se enfrían y se retira el líquido alantoideo que contiene la VIS.

15

20

25

30

285077



El producto crudo que contiene la VIS se trata con un precipitante de proteínas, como ácido perclórico, ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico, tetrametafosfato o similares, para precipitar el virus (por ejemplo, la vacuna vírica) y una gran cantidad de proteína inactiva. El producto crudo se mantiene a una temperatura de 0° a 30°C., mejor entre 0° y 5°C., mientras se añade precipitante de proteínas, que ha de bastar para obtener una concentración final entre 1 y 3%.

La VIS, estable a pH bajo, queda en el líquido de encima y puede precipitarse del mismo ajustando el pH entre 6 y 8, y mejor entre 7 y 8, con una base energética, a ser posible hidróxido sódico o potásico, y añadiendo luego solución de una sal de metal pesado, a concentración aproximada 5 a 50 milimolar, y mejor entre 10 y 20 milimolar. Sales de metales pesados especialmente útiles para precipitar la VIS son los haluros de cobalto, cinc, calcio, mercurio, estroncio, bario y análogos, o sales de un ácido orgánico, en particular acetatos de cobalto, cinc, calcio, mercurio, estroncio o bario, y los respectivos glicinatos lactatos, propionatos o cloruros. Para todos los fines prácticos, puede emplearse acetato de cinc, por ser fácilmente asequible y muy adecuado como precipitantes para la VIS.

El precipitado de sal de metal pesado que contiene VIS se retira con preferencia centrifugando o por otros medios mecánicos. El sólido obtenido se agita luego a 0-5°C., y se trata con suficiente ácido energético para obtener un pH aproximado de 2-3, a fin de solubilizar selectivamente la VIS, o con un quelante, para fijar por selec-

285377



5 ción la sal de metal pesado mientras la VIS permanece en
solución. Agentes apropiados son los ácidos fuertes, inor-
gánicos u orgánicos, como el perclórico, el clorhídrico,
el tricloroacético y similares, o quelantes como verseno
(sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético). En
esta operación puede emplearse con ventaja ácido clorhídri-
co 0,2n. Seguidamente, la solución obtenida se clarifica
centrifugando, y el líquido de encima, que contiene en so-
lución la sal de metal pesado y la VIS, se dializa frente
10 a la solución salina, para eliminar la sal de metal pesado
remanente.

La solución dializada resultante (que desde ahora
se denominará solución dializada I) contiene una concen-
tración diez a veinte veces mayor de VIS.

15 La solución dializada I de VIS, si se quiere, pue-
de concentrarse más repitiendo la precipitación antes des-
crita con una sal de metal pesado, seguida de diálisis,
para obtener una concentración cien veces mayor de VIS con
purificación diez a veinte veces mayor en la solución dia-
lizada II.

20 Las soluciones dializadas I o II contienen una
concentración útil de VIS para prevenir la infección por
el virus de la enfermedad de Newcastle, como se verá des-
pués, o para reprimir la tumoración por el virus del sar-
coma de Rous en la membrana alar de polluelos de un día.

25 La VIS de las soluciones dializadas I o II puede
purificarse más mediante cromatografía sobre una resina
carboxílica de intercambio catiónico en forma progresiva
continua o mejor en forma escalonada, empleando como eluen-
te un moderador acuoso de acetato o fosfato. Si se quiere,
30

28 FEB



pueden aumentarse la concentración y la purificación precipitando de nuevo la VIS del eluente, con ayuda de una sal de metal pesada, como ya se ha dicho. Esto permite alcanzar una purificación 2000 veces mayor.

5 Se prepara una columna de adsorción pasando un moderador o tampon acuoso, como solución de acetato o fosfato, con pH aproximado de 5,8 a 6,4 a través de una columna del adsorbente, hasta que la descarga tenga un pH de 5,8 a 6,4. Una solución de VIS con actividad aproximada de 3200 a 25000 unidades por mililitro, dializada
10 frente a un tampon de 5,8 a 6,4 de pH, con potencia iónica de 0,03 a 0,08, se añade a una columna de carboximetilcelulosa u otros permutadores catiónicos débiles, como una resina carboxílica de intercambio iónico. Terminada
15 la adición, se pasa a través de la columna más solución moderadora de pH 5,8 a 6,4, lo cual elimina una cantidad considerable de proteínas sin actividad de VIS. La concentración de proteínas en la descarga se mide por el método colorimétrico de Lowry, según se describe en J.Biol.
20 Chem., 1951, 193:265-75, por O.H.Lowry y otros, con el título de "Medición de Proteínas con el reactivo de folinfolenol".

Se elimina otra cantidad de material proteinífero sin actividad de VIS haciendo pasar lentamente a través
25 de la columna una solución tampon con pH de 5,8 a 6,4, y aumentando gradualmente la potencia hasta 0,13, hasta que la descarga se halla casi exenta de proteínas. Esta solución se prepara a partir de otra solución tampón con pH de 5,8 a 6,4 aproximadamente, por adición de una sal inorgánica, con preferencia cloruro sódico.
30



Del adsorbente se retira VIS esencialmente purificada pasando a través de la columna una solución tampon con pH aproximado de 7,4 a 8,8 y potencia iónica de 0,13 a 0,18.

5 La resina empleada para adsorber la VIS es, con preferencia, una resina carboxílica de intercambio catiónico, y para los fines de este invento sirve cualquiera de las de tipo carboxílico disponibles. Se ha comprobado que la carboximetilcelulosa (CMC) preparada según el método
10 descrito por Peterson y Sober, J.Am.Chem.Soc., 1956, 78:756, es muy eficaz para conseguir una buena adsorción y eliminación de la VIS. Otras resinas carboxílicas adecuadas de intercambio de cationes son Amberlite IRC-50 y Amberlite
15 XE-54, expandidas ambas por Rohm & Haas Co., o la permutita H-70, de Permutit Company, u otras disponibles de esta clase.

La VIS concentrada y muy purificada que se obtiene sirve, como se expondrá luego, para entorpecer la multiplicación del virus de la enfermedad de Newcastle, y por eso
20 es potencialmente útil para prevenir esa dolencia en las aves. Además, obstaculiza la capacidad del virus del sarcoma de Rous para fomentar el desarrollo de tumores.

La porción mayor de impurezas residuales, si las hay, en la solución cargada de VIS obtenida como queda descrito, puede retirarse por iontoforesis o por electroforesis por zonas.
25

La solución cargada de VIS que se obtiene tras cromatografía se purifica más por iontoforesis, empleando papel de acetato de celulosa o cualquier otro tipo de papel que adsorba poca VIS. Dicha solución se aplica en faja es-
30



5 trecha sobre papel de acetato de celulosa u otro apropiado, con los extremos sumergidos en vasos de electrodos que contengan cualquier solución tampon de pH 4-10, con preferencia tampon de borato con pH de 8,9. Se aplica durante una a tres horas una corriente eléctrica de 0,4 mA/cm. de anchura del papel. Éste se corta luego en tiras estrechas, y la VIS se extracta con solución salina al 0,9% que contenga ácido acético 0,05n, o albúmina de suero bovino y Tween 80.

10 Alternativamente, se pueden purificar cantidades mayores de VIS cromatografiadas, mediante electroforesis por zonas sobre un lecho o una columna de Pevikon C-870 (copolímero de acetato y cloruro de polivinilo, producto de Stockholm Superfosfat Fabriks A.-B., Estocolmo, Suecia), papel de acetato de celulosa en polvo, o cualquier otro medio que adsorba poca VIS. Se aplica una solución concentrada que contenga VIS en una hendidura practicada en un lecho ya prevenido de Pevikon C-870 u otros medios apropiados, con los extremos conectados mediante papel de filtro a vasos de electrodos que contengan cualquier tampon conveniente de pH 4 a 10, con preferencia tampon de borato con pH de 8,9. Se aplican entre 0 y 15°C., de 6 a 18 horas, 5-10 voltios por centímetro de longitud de base, pero manteniendo mejor la temperatura a 0-5°C. El lecho o base se divide luego en segmentos estrechos, que se extractan con solución salina al 0,9% que contenga ácido acético 0,05n o albúmina de suero bovino y Tween 80.

25 El esquema del proceso que forma parte de la presente solicitud e ilustra un ciclo típico en el que se concentra y purifica la VIS a partir del líquido alantoi-

30

28
285877



deo del huevo, se describe seguidamente con más detalle en el ejemplo.

EJEMPLO

Concentración y purificación de VIS

5 Fase 1.

A 50 litros de líquido alantoideo de huevo que contienen 256 unidades de actividad de VIS por mililitro (véase la nota 1 a la siguiente tabla de definición de unidad) se añadieron 5,5 litros de ácido perclórico 1,5n, 10 agitando rápidamente a 5°C. Después de 30 minutos de reposo, la mezcla se centrifugó 30 minutos a 1500 rpm. en una centrifuga refrigerada.

Esta fase suele realizarse empleando ácido tri- 15 cloroacético, ácido sulfosalicílico o tetrametafosfato en vez de ácido perclórico, y los resultados son similares.

El líquido alantoideo empleado en esta fase se pre- 20 paró inyectando en el alantoides $10^{4,50}$ EID₅₀ de virus de gripe A, cepa WS. E 5372, en una dosis de vacuna de 0,20 ml. a cada huevo de gallina empollado de 9-10 días, incu- bándolos 96 horas a 36-37°C. enfriándolos luego, y reti- rando el líquido alantoideo cargado de VIS.

Fase 2.

El líquido sobrenadante (55 litros, con 256 unida- 25 des de actividad de VIS por mililitro) se ajustó a un pH de 7-8 con hidróxido sódico, y se añadió acetato de cinc 0,4m, agitando, hasta una concentración final 20 milimolar. Después de una noche de reposo a 5°C., se extrajo por as- piración todo el líquido posible, y la suspensión remanente

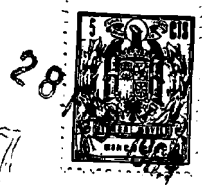
285877



de precipitado de cinc se centrifugó una hora a 1500 rpm.
en una centrífuga refrigerada. El precipitado recogido,
que contenía acetato de cinc y VIS, se agitó con HCl 0,2n
frío (0-5°C) suficiente para reducir el pH a 2-3, a fin
5 de disolver el precipitado. La solución se clarificó
centrifugando a 1500 rpm. durante una hora en una centri-
fuga refrigerada. La solución obtenida, cargada de VIS,
que se había concentrado veinte veces, hasta 2,6 litros,
se dializó por la noche frente a 10-20 volúmenes de clo-
10 ruro sódico al 0,9%, para eliminar los iones de cinc y
dar una solución que contenía 3.840 unidades de activi-
dad de VIS por mililitro.

Fase 3:

El concentrado a 20:1, dializado, se ajustó a un
15 pH de 7,0-7,2 con hidróxido sódico, y se añadió acetato
de cinc 0,4m, agitando, hasta una concentración 20 mili-
molar. Después de un reposo de tres horas o más a 5°C.,
el precipitado se centrifugó una hora a 2000 rpm. Se dese-
chó el líquido de encima, y el precipitado se disolvió
20 en HCl 0,2n frío (0-5°C) suficiente para obtener un pH
de 2-3, y luego se dializó durante la noche frente a 50-
100 vols. de cloruro sódico al 0,9%, para retirar los
iones de cinc. La solución de VIS (490 ml.) se concentró
cien veces y se purificó diez a veinte veces por este mé-
25 todo y tenía 12.800 unidades de actividad por mililitro.
Resultados similares se pueden obtener empleando cualquie-
ra de los precipitados cloruros de metales pesados o sales de
metales pesados de ácidos orgánicos, especialmente de los
ya mencionados.



La VIS se purificó más mediante cromatografía sobre carboximetilcelulosa, empleando un escalonamiento de cloruro sódico y de pH en un tampón o moderador de fosfato 0,01m. como sigue:

5 a) La VIS cien veces concentrada (490 ml.) de la fase 3 se dializó por la noche frente a 30 vols. de fosfato sódico 0,01m. con pH de 6.

10 b) La solución dializada de VIS se aplicó a una columna de carboximetilcelulosa de 30'5 x 2 cm, ya equilibrada con fosfato sódico 0,01m de pH 6.

c) Se practicó una cromatografía empleando la adición escalonada a la columna de los siguientes moderadores o tampones:

	Moderador	Volumen (ml.)
15	Fosfato 0,01m, pH 6	250
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,05m	500
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,10m	2500
	Fosfato 0,01m, pH 8 - NaCl 0,10m	500

20 d) Se eluyó la VIS con fosfato 0,01m de pH 8, que contenía NaCl 0,10m. La actividad máxima (19.200 unidades/ml.) correspondía a una fracción de 120 ml. Las otras fracciones se pueden cromatografiar de nuevo, a fin de concentrar y purificar más VIS en cada una de ellas y aumentar así el rendimiento.

25 Fase 5.

Para practicar una segunda cromatografía, la precitada fracción de 120 ml. de VIS se concentró a 8,5 ml. precipitando acetato de cinc como se describe en la fase 3, para obtener una solución cargada de VIS con 153.600 unidades de actividad por mililitro.

30

28
285877



Fase 6.

La fracción de VIS concentrada en acetato de cinc de la fase 5 se dializó frente a 100 vols. de fosfato 0,01m con pH de 6, y se aplicó a una columna de carboximetilcelulosa de 5 x 1'3 cm, ya equilibrada con el mismo moderador. La segunda cromatografía se hizo mediante adición gradual a la columna de los siguientes moderadores o tampones:

	<u>Moderador</u>	<u>Volumen (ml.)</u>
10	Fosfato 0,01m, pH 6	10
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,05m	10
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,06m	10
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,07m	10
	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,08m	10
15	Fosfato 0,01m, pH 6 - NaCl 0,10m	50
	Fosfato 0,01m, pH 8 - NaCl 0,10m	50

Se eluyó la VIS con fosfato 0,01m, pH 8, que contenía NaCl 0,1m, y la actividad máxima (76.800 unidades/ml.) correspondió a un volumen parcial de 13,5 ml. Las otras fracciones pueden ser objeto de otra cromatografía, para concentrar y purificar más VIS en cada una y aumentar el rendimiento.

Fase 7.

La fracción activa se concentró más, hasta 4 ml. por precipitación de cinc y diálisis, según se describe en la fase 3, para obtener 225.000 unidades de actividad de VIS por mililitro.

Fase 8.

Se separó VIS de la porción mayor de impureza re-

28 FEB



285077

sidual remanente de la fase 7, aplicando con una pipe-
ta una porción de 0,4 ml. de la misma en una estrecha
rendija hecha en un bloque de Pevikon C-870 de 17 x 2
cm. Un extremo del bloque de Pevikon se conectó me-
5 diante papel de filtro a un electrodo positivo, y el
opuesto se unió con papel de filtro a un electrodo ne-
gativo; los electrodos estaban sumergidos en moderador
de borato sódico 0,03m, ajustado a un pH de 8,9 con áci-
do clorhídrico. Se hizo pasar una corriente de 3 mA
10 (150-170 voltios) a través del bloque de Pevikon duran-
te siete horas. Al final del ciclo, el bloque de Pevi-
kon se cortó en tiras de 1 cm. o de 0,5 cm. según se
indica en la siguiente tabla, y cada tira se extractó
por separado con una solución que contenía ácido acéti-
15 co 0,05n y cloruro sódico al 0,9%; los extractos se
analizaron individualmente para hallar las proteínas y
la actividad de la VIS. Los datos obtenidos se consig-
nan en la siguiente tabla, donde también se indican las
superficies de las secciones o tiras del bloque de Pevi-
20 kon; las superficies "✓" se cortaron del extremo del
bloque unido al ánodo, y las "-" del extremo unido al
cátodo. Los dos primeros segmentos positivos y los dos
últimos negativos eran de 1 cm., y los restantes, de
0,5 cm. cada uno



Tabla I

<u>Sección analizada, cm. desde origen</u>	<u>Extrac- tivo, ml. usados</u>	<u>Actividad de VIS⁽¹⁾</u>		<u>Proteína⁽²⁾ mg/ml.</u>	<u>Actividad espec. unidades/mg. de proteína</u>
		<u>Unida- des/ml.</u>	<u>Activi- dad total</u>		
/ 3	4	0	0	-	-
/ 2	4	48	192	.0036	-
/ 1.5	2	1280	2560	.0072	178,000
/ 1.0	2	2560	5120	.0108	236,000
/ 0.5	2	1280	2560	.0086	150,000
- 0.5	2	768	1536	.028	-
- 1.0	2	256	512	.027	-
- 1.5	2	256	512	.025	-
- 2	4	0	0	.016	-
- 3	4	0	0	.007	-

Preparada la VIS como solución concentrada, según queda descrito, es estable si se conserva a 0-5°C. Si el material concentrado y purificado se diluye, o sea, está presente a concentración reducida, se adhiere a superficies de vidrio. Esto se puede evitar incorporando pequeñas cantidades de albúmina, gelatina, Tween 80 y otros desorbentes a la solución de VIS, o conservando la solución diluida en recipientes inertes de plástico, por ejemplo, de polipropileno.

5



Los grados de concentración y purificación de VIS obtenidos en las diversas fases del procedimiento aquí descrito se resumen en la siguiente tabla:

T a b l a II

<u>Fase de fraccionamiento</u>	<u>Volumen</u>	<u>Actividad de VIS(1) unidades/ml.</u>	<u>Proteína(2) mg/ml.</u>	<u>Activ. espec.(3) unidades/mg. de proteína</u>	<u>Recuperación por 100</u>	<u>Factor de purificación(4)</u>
<u>Producto crudo</u>	<u>50 litros</u>	<u>256</u>	<u>5,0</u>	<u>52</u>	<u>-</u>	<u>-</u>
1. Líquido sobrenadante de tratar el producto crudo con ácido perclórico	55 litros	256	2,2	116	100	2,25
2. Primera precipitación de cinc	2,6 litros	3,840	7,4	520	75	10
3. Segunda precipitación de cinc	490 ml.	12,800	15,6	820	50	16
4. Primera cromatografía sobre CMC	120 ml.	19,200	0,38	50,500	18	970
5. Concentración de la fracción activa de la columna con acetato de cinc	8,5 ml.	153,600	2,7	57,000	10,2	1100
6. Segunda cromatografía sobre CMC	13,5 ml.	76,800	0,85	92,000	8	1750
7. Concentración de la fracción activa con cinc	4 ml.	225,000	2,38	95,000	7,2	1830
8. Purificación final sobre Pevikon C-870	20 ml.	2,560	,0108	236,000	-	4000



NOTAS a las tablas I y II:

5 1) Una unidad de actividad se evalúa por la inter-
ferencia con virus de encefalomiелitis equina oriental
(EEE) en cultivos de células de embrión de pollo en una
sola capa. Se añaden diluciones en serie de líquido car-
gado de VIS, en porciones de 1 ml. a los cultivos de célu-
10 las, y se incuba durante seis horas a 37°C. Después de re-
tirar el líquido, cada cultivo de células tratado se prue-
ba con 100 dosis infecciosas de cultivo de tejidos (TCID₅₀)
de EEE. La unidad de VIS se expresa como recíproca de la
15 dilución máxima de líquido cargado de VIS que evita total-
mente la citopatología en el cultivo de células.

2) Determinación por el método descrito por O.H.
Lowry y otros en "Medición de proteínas con reactivo de
15 folinfenol", J.Biol.Chem., 1951, 193:265-75.

3) Actividad específica.

4) Actividad específica del material de ensayo =
Actividad específica del producto crudo

= Factor de purificación

20 La VIS concentrada por el procedimiento que antece-
de, fases 1 a 7, se ensayó en cuanto a efecto sobre el vi-
rus de la enfermedad de Newcastle en polluelos de un día,
y pudo comprobarse que preservaba a algunos de ellos de la
muerte provocada por el virus, además de prolongar el lap-
25 so de supervivencia de los pollos no preservados del todo
por la VIS. Los estudios se realizaron por dos métodos:
Según uno de ellos, se administró VIS en dos dosis, 24 y
6 horas antes de poner a prueba los pollos. Según otro,
se hizo lo mismo, y luego a diario, comenzando 18-20 horas



Después de la infección por virus, las veces indicadas en la tabla siguiente. Las unidades indicadas de VIS se administraron por vía intraperitoneal en forma de 0,5 ml. de vacuna. También se aplicó virus de Newcastle por vía intraperitoneal en forma de 0,5 ml. de vacuna con 5 DL₅₀. Con fines de comparación, el producto crudo, o sea el líquido alantoideo cargado de VIS (fase 1) empleado como material de partida en el nuevo procedimiento de este invento, se probó juntamente con la preparación concentrada de VIS obtenida por la segunda fase de precipitación con acetato de cinc (fase 4). Asimismo se incluyeron aves testigos tratadas sólo con la dosis de prueba de 5 DL₅₀ de virus de enfermedad de Newcastle en 0,5 ml. de vacuna. Los resultados de este estudio se exponen en la siguiente tabla:

T a b l a I I I

Medición del efecto de administrar VIS cruda y concentrada sobre virus de la enfermedad de Newcastle en polluelos de un día.

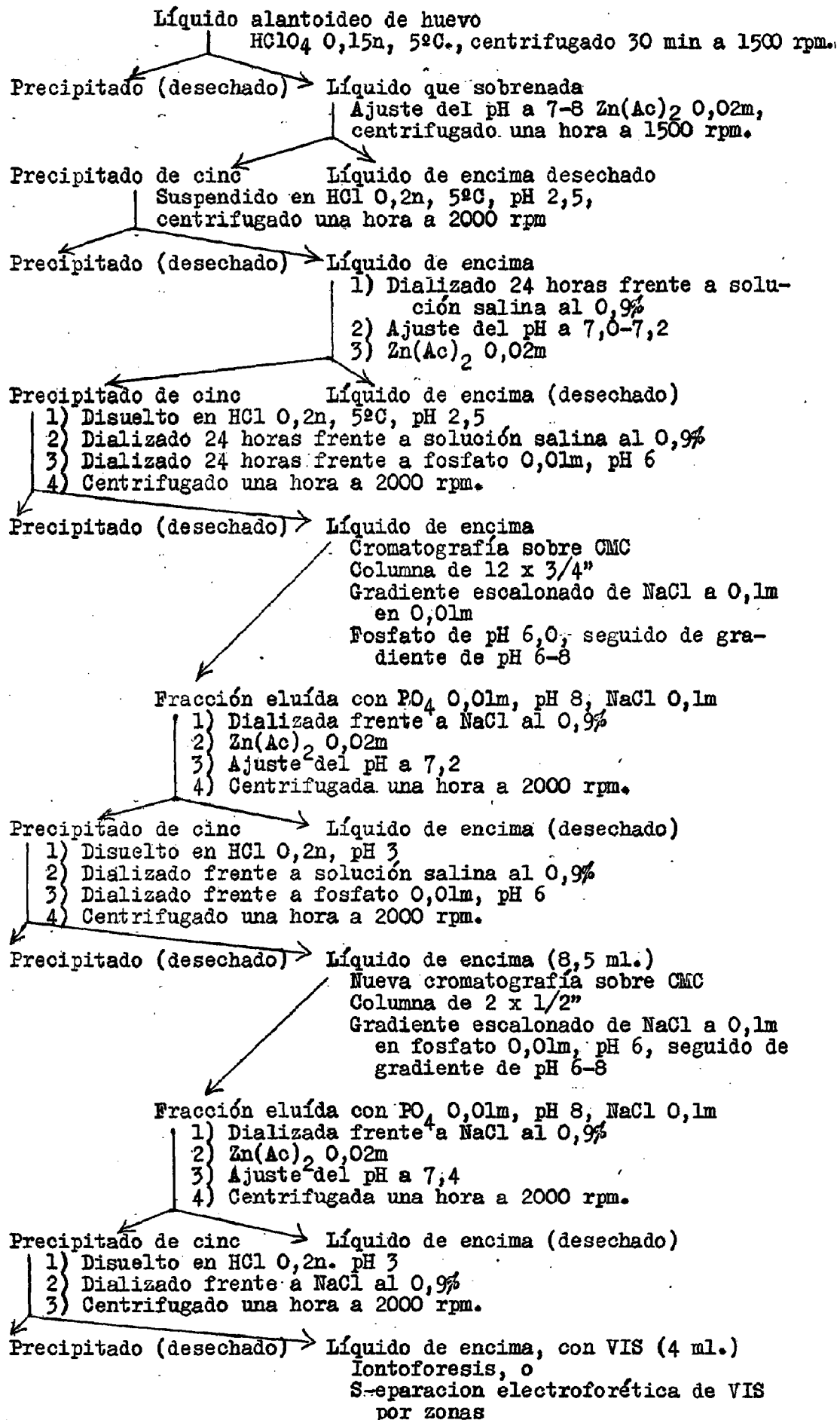
Régimen de tratamiento con VIS					Resul- tados Nº de super- vivien- tes/to- tal de aves	Super- viven- cia (%)	Prome- dio de super- viven- cia (dias)	Super- viven- cia Exceso	Indices Exceso de supervi- vencia (dias)
Fracción de VIS	Virus pre- vio	con- se- cutivo	Total de uni- dades						
Fase 1	2x64	U ⁺	128	3/10	30%	9,9	23,3%	2,2	
"	2x64	U 5x64	448	4/15	27%	10,0	20,3%	2,3	
Fase 4	2x3200	U	6,400	6/10	60%	13,8	53,3%	6,1	
"	2x3200	U 5x3200	72,400	5/15	33%	10,5	26,3%	2,8	
Control	-	-	-	2/30	6,7%	7,7	-	-	

⁺Dos dosis, cada una con 64 unidades de VIS.

Como resumen se expone a continuación un esquema del proceso.



Esquema del proceso de purificación de la substancia virostática





-----: N O T A :-----

Se reivindica como objeto de esta patente:

- 5 1.- Procedimiento para concentrar y purificar substancia inhibidora de virus, o substancia virostática (denominada VIS), el cual comprende añadir un precipitado de proteínas, a una concentración final de líquido alantoideo que contiene 1-3% de VIS, ajustar el líquido de encima a un pH de 6-8, y agregar luego una sal de metal pesado para precipitar también la VIS.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el precipitante de proteínas se elige del grupo integrado por ácido perclórico, ácido tricloroacético, ácido sulfosalicílico y tetrametafosfato.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se elige una sal de metal pesado del grupo que comprende sales de cobalto, cinc, calcio, mercurio, estroncio y bario de ácido acético, glicina, ácido láctico, ácido propiónico y ácido clorhídrico.
- 20 4.- Procedimiento para concentrar substancia inhibidora de virus, el cual comprende añadir ácido perclórico, a una concentración final entre 1 y 3%, al líquido alantoideo cargado de VIS, ajustar el líquido de encima a un pH entre 6 y 8, y agregar luego acetato de cinc para precipitar también VIS.
- 25 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el precipitado que contiene acetato de cinc y VIS se dializa para retirar el acetato de cinc.
- 30 6.- Procedimiento para concentrar y purificar substancia inhibidora de virus, el cual comprende añadir un precipitante de proteínas, a una concentración final de



1-3%, a líquido alantoideo cargado de VIS, ajustar el líquido que sobrenada a un pH de 6-8, y agregar luego una sal de metal pesado para precipitar también VIS; dializar el precipitado para retirar la sal de metal pesado; atemperar la solución de VIS entre 5,8 y 6,4 de pH y una potencia iónica aproximada de 0,03 a 0,08; añadir la solución a un adsorbente de resina carboxílica de intercambio catiónico, equilibrado entre 5,8 y 6,4 de pH; retirar el material inactivo pasando por encima del adsorbente de resina un moderador de pH entre 5,8 y 6,4 y aumento gradual de la potencia iónica desde 0,03-0,08 a 0,13, aproximadamente, y desorber la VIS pasando por el adsorbente de resina un moderador con pH de 7,4 a 8,8 y una potencia iónica aproximada de 0,13-0,18.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la elución de material inactivo y activo del adsorbente de resina carboxílica de intercambio de cationes se efectúa según un escalonamiento de la potencia iónica y del pH, en un moderador o tampon seleccionado del grupo constituido por los de acetato y fosfato.

8.- Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el componente VIS del líquido obtenido se separa de la cantidad mayor de impurezas residuales mediante electroforesis por zonas, a temperaturas inferiores a la ordinaria.

9.- Procedimiento para concentrar y purificar sustancia inhibidora de virus, el cual comprende añadir ácido perclórico, a una concentración final aproximada de 1 a 3%, ajustar el líquido de encima a un pH aproximado de 6 a 8, y agregar luego acetato de cinc para precipitar también

285877



VIS; dializar la VIS frente a un moderador de pH 6 y potencia iónica entre 0,03 y 0,08, para retirar el acetato de cinc; añadir un tampon de fosfato con pH de 6 a la solución de VIS; agregar la solución a una columna de carboximetilcelulosa equilibrada a un pH aproximado de 6; retirar la substancia inactiva pasando escalonadamente por la columna moderador de fosfato con pH 6 y potencia iónica de 0,03, luego moderador de fosfato con pH 6 y potencia iónica de 0,08, y después moderador de fosfato con pH 6 y potencia iónica de 0,13, y eluyendo la VIS con moderador de fosfato de pH 8 y potencia iónica de 0,13.

10.- Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el componente VIS del líquido obtenido se separa del grueso de las impurezas residuales mediante electroforesis por zonas sobre Pevikon C-870 a una temperatura inferior a la del ambiente, empleando de unos 5 a 10 voltios por cm. de longitud de la base o lecho.

11.- Procedimiento para concentrar y purificar substancia inhibidora de virus.

Esta memoria consta de veintiuna páginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, 28 FEB. 1969

P. A.