

327373

31 MAY, 1956



P.-32.043

V 1.848-Esp.

327373

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 TEXIM ENTREPRISE ECONOMIQUE D'ETAT, entidad
búlgara establecida en 25, Uliza Aksakov, -Sofia, Bulgaria,
por:

"UN PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UNA SUSTANCIA ANTICAN-
CEROSA ACTIVA"

=====

El invento tiene como objeto un procedimiento de
fabricación de una sustancia anticancerosa activa que es-
tá caracterizada porque se cultiva un microorganismo del
género LACTO-BACILLUS, cuyo microorganismo produce sustan-
5 cia anticancerosa en el seno de sus cultivos y la acumula
en las células bacterianas, y porque se extrae y purifica
la sustancia anticancerosa.

En los dibujos:

La Figura 1 representa el espectro ultravioleta del ácido
10 ribonucléico y,

la Figura 2 representa el espectro infrarrojo del ácido

3273733



ribonucléico.

Los diferentes resultados están representados en una Tabla sinóptica al final de esta Memoria.

5 Se han descrito hasta ahora como agentes anticancerosos, algunos productos sintéticos, extractos de animales y de plantas, y productos procedentes de microbios. Sin embargo, no son satisfactorios, ya que no actúan únicamente sobre las células cancerosas, sino que también dañan los tejidos normales.

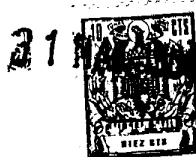
10 La sustancia anticancerosa obtenida por el presente procedimiento es totalmente diferente por su acción biológica y por su naturaleza química a todas las sustancias anticancerosas conocidas hasta ahora y actúa de manera selectiva sobre las células cancerosas.

15 La nueva sustancia anticancerosa posee una acción de inhibición de los tumores, al mismo tiempo que una fuerte acción productora de necrosis de los tumores. Una inyección intravenosa de la sustancia puede conducir a una destrucción total incluso de grandes tumores y curar completamente casi la mitad de los animales tratados, mientras
20 que las sustancias anticancerosas conocidas hasta ahora no tienen una acción de inhibición sobre el tumor más que cuando son aplicadas inmediatamente después de la implantación del tumor.

25 La nueva sustancia anticancerosa estimula al mismo tiempo las fuerzas de resistencia del organismo.

En los tejidos cancerosos, se observan cambios ya 8 horas después de la inyección intravenosa de la sustancia anticancerosa. Estudios microscópicos han demostrado que
30 la sustancia actúa de manera selectiva sobre las células

327373



cancerosas y no actúa sobre los vasos sanguíneos y los otros tejidos normales. La sustancia estimula la médula de los huesos y su hemopoesis, mientras que los otros materiales anticancerosos la impiden.

5 Todos estos hechos demuestran que la sustancia anticancerosa es sensiblemente diferente a los materiales anticancerosos conocidos hasta ahora y su naturaleza química lo confirma.

10 Desde el comienzo de las investigaciones se han estudiado las propiedades anticancerosas de diversos microorganismos. Cultivos y extractos de estos microorganismos han sido inyectados por vía intravenosa a ratones que llevaban sarcomas 180 (Sarcoma de Krock), bien desarrollados, implantados por vía intradérmica. El efecto anticanceroso ha sido observado en las sustancias obtenidas a partir de cultivos de los bacilos del género LACTOBACILLUS . Se ha observado un efecto marcado con el LACTOBACILLUS BULGARICUS, CEPA 51, aislado de la leche cuajada (yogourt). 24-28 horas después de la inyección de los cultivos de esta cepa, se observa, para casi todos los tumores, una necrosis bien marcada y algunos días más tarde, un tercio aproximadamente de los animales tratados está completamente curado.

25 Una actividad parecida, aunque menos fuerte, ha sido observada en los estudios de determinadas cepas de las especies LACTOBACILLUS BULGARICUS, lactobacillus casei, lactobacillus helveticus y lactobacillus acidophilus.

 El LACTOBACILLUS BULGARICUS LB-51 está constituido por bacilos cuyas dimensiones están comprendidas entre 5 y 7 micras, gram-positivos, dispuestos en parejas o en cadenas de longitudes diferentes según el medio nutritivo.

327373



En los cultivos líquidos da un sedimento pastoso mientras que en medios que contienen agar, forma pequeñas colonias fibrosas.

5 Sus otras propiedades bioquímicas están mostradas en la Tabla de la Figura 1, en comparación con las propiedades de las otras cepas anticancerosas del género LACTOBACILLUS.

10 La característica morfológica y fisiológica de todas estas cepas activas anticancerosas corresponde a la descripción hecha en Berger's Manual of Determinative Bacteriology de Robert S. Breed, séptima edición, pero al mismo tiempo poseen una particularidad característica, razón por la cual son designadas por "varietas tumoronecroticans". Las características morfológicas y biológicas de determinadas cepas anticancerosas activas están indicadas en la 15 Tabla de la Figura 1. Es evidente que el invento actual no está limitado solamente a las cepas antes citadas, que no representan más que una ilustración del descubrimiento, sino que se refiere a las cepas "tumoronecroticans" en general. 20

El cultivo y la acumulación de la sustancia anticancerosa de las "varietas tumoronecroticans" de los bacilos del género Lactobacillus dependen del medio nutritivo. Se pueden utilizar medios nutritivos que contienen diversos 25 factores alimenticios. Como fuente de nitrógeno se pueden emplear peptonas, extractos de carne, maiz, soja, levadura, etc., mientras que como fuente de carbono se pueden utilizar glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, melaza, etc. Como fuentes de fósforo se pueden utilizar hidrolizados de 30 levadura, fosfatos, etc. Como materiales nutritivos se pue-



de utilizar al menos un miembro de los grupos de las fuentes de nitrógeno y de carbono. Se ha comprobado que añadiendo pequeñas cantidades de sales inorgánicas tales como los fosfatos de sodio y potasio, el sulfato de magnesio y otros, se refuerza la actividad anticancerosa.

El cultivo se puede efectuar en condiciones de anaerobiosis, sin aireación, a una temperatura comprendida entre 45°C y 35°C, que se ha revelado como óptima para una duración de 18-24 horas.

En el curso de la fermentación, el pH del cultivo baja a 3,8. Durante este tiempo no es necesario controlar el pH.

En el período de fermentación, la sustancia anticancerosa se acumula, sobre todo en las células bacterianas.

En el caso en que se produce una autólisis de las células bacterianas, se comprueba igualmente la actividad anticancerosa en el líquido de los cultivos. La sustancia anticancerosa puede ser extraída con agua después de la destrucción de las membranas de las células bacterianas.

Esto no tiene nada que ver con el ácido láctico, al que V. Carminati ha atribuido una acción anticancerosa. (Boll. Inst. Sieroterap. Milanese 12: 205-220, 1.933).

La sustancia anticancerosa no posee propiedades antimicrobianas y es enteramente diferente a los materiales antimicrobianos producidos por bacilos del género *Lactobacillus* y descritos por Bogdanov (Oeuvres scientifiques de ISUL, Institut de specialisation et perfectionnement des medivins, 2, 1952, 131-139) Wheater, Hirsch Mattick (Nature 1.952, vol. 168, 659) y James Vincent Co (J. Bacteriology, 78, 477-84, 1.959).

327373



Una vez terminada la fermentación, la sustancia anticancerosa contenida en las células bacterianas puede ser extraída y purificada de diferentes maneras.

5 La purificación puede comprender al menos una operación de extracción y una operación de precipitación, que pueden ser aplicadas solas o varias veces en diferentes combinaciones, tal como se indica, en el esquema siguiente:

E - extracción	E - P
P - precipitación	E - P - E
	E - P - E - P
	E - P - E - P - E - P etc.

I - El proceso de la extracción.

10 La extracción de la sustancia anticancerosa se puede efectuar con ayuda de al menos uno de los disolventes del grupo del agua y del fenol. Se utiliza una materia prima bajo forma sólida para la extracción acuosa, mientras que para la extracción con fenol se pueden utilizar soluciones acuosas de la sustancia anticancerosa o de los ma-
15 teriales que la contienen.

Como materiales sólidos, que contienen la sustancia anticancerosa, hay que mencionar las células bacterianas naturales, las células bacterianas secas desengrasadas,
20 las células bacterianas extraídas precedentemente para eliminar los materiales inertes, y los materiales secos obtenidos como productos de las extracciones y precipitaciones, descritos más adelante.

La extracción acuosa se puede efectuar por mezcla del agua y del material que comprende la sustancia anti-



5 cancerosas. Cuando este material está constituido por células bacterianas, es necesario desintegrarlas con ayuda de un homogeneizador, de un molino de coloides, de ultrasonidos o de enzimas tales como la lizosima, la pepsina y otras. La mezcla puede ser filtrada o centrifugada para eliminar los materiales insolubles. Entonces, la mayor parte de la actividad anticancerosa ha pasado al extracto acuoso. La extracción acuosa se efectúa a una temperatura que varía entre 0°C y 18°C. Es preferible que el pH del agua esté comprendido entre 4 y 9. Un pH más bajo provoca una precipitación, mientras que un pH más alto hace inactiva a la sustancia anticancerosa. La adición de un tampón de fosfato y de 0,01 moles de sulfato de magnesio mejora las propiedades de extracción acuosa.

15 El proceso de extracción con fenol se puede efectuar por extracción de los materiales sólidos con fenol al 96% o añadiendo un volumen igual de fenol al 96% a las soluciones acuosas o a las suspensiones que contienen la sustancia anticancerosa.

20 En los dos casos, después de una agitación enérgica de las mezclas, se puede centrifugarlas para separar la capa de fenol, los residuos insolubles y la capa acuosa. La sustancia anticancerosa pasa al fenol y se separa cuando se utilizan los procedimientos seguidamente descritos. La extracción con fenol se puede efectuar a una temperatura comprendida entre 4 y 70°C.

2 - Los procesos de precipitación

La precipitación de la sustancia anticancerosa se

327373

31



puede realizar con ayuda de una adición de diferentes sales, de disolventes orgánicos solubles en agua y/o ácidos. Estos procesos de precipitación pueden ser aplicados a los extractos acuosos así como a los extractos fenólicos.

5 Cuando la precipitación se efectúa por medio de una adición de diferentes sales, se prefiere el sulfato de amonio, el cloruro de amonio o el sulfato de magnesio. Cuando se utiliza sulfato de amonio, la cantidad depende de la saturación que se quiera alcanzar, la cual puede estar
10 comprendida entre 0,1 y 0,8=. La sustancia anticancerosa pasa al precipitado. El resto de las sales del precipitado puede ser eliminado por un procedimiento tal como la diálisis, la filtración por el "sephadex" o la disolución y después se puede repetir la precipitación con ácido,

15 Cuando la precipitación se efectúa con disolventes orgánicos solubles en agua se pueden utilizar metanol, etanol, acetona, etc. Es preferible utilizar de 1 a tres volúmenes del disolvente por cada volumen de la primera solución.

20 En el caso de la precipitación con ayuda de ácidos, es preferible que el pH esté comprendido entre 1,5 y 4. En este sentido, se pueden utilizar ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido ecético, ácido
25 oxálico, etc.

Se puede utilizar clara de huevo y enzimas para la desintegración de las células bacterianas y para la extracción de la sustancia anticancerosa, sin que las enzimas entren en reacción con la sustancia activa químicamente.
30 Contribuyen únicamente a la eliminación de los materiales



inertes, que no tienen ninguna relación con la acción anticancerosa.

5 Este procedimiento está unido a la utilización de la clara de huevo o de la lizosima que contienen pepsina y de tripsina. Las enzimas pueden ser utilizadas sucesivamente en combinaciones diferentes según los fines a alcanzar, tal como lo harán ver los ejemplos 13 a 19.

10 Como material de partida, se pueden utilizar células bacterianas naturales del microorganismo productor, así como células bacterianas liofilizadas, células bacterianas desengrasadas secas, células bacterianas tratadas previamente para eliminar determinados cuerpos inertes y también preparaciones de sustancia anticancerosa, obtenidas como resultado de una purificación química.

15 La sustancia anticancerosa obtenida tal como se describe anteriormente, se caracteriza por las propiedades siguientes:

1. La sustancia anticancerosa es soluble en agua alcalina y neutra, pero precipita a un pH inferior a 4.

20 2. La sustancia anticancerosa no puede ser disuelta prácticamente por disolventes orgánicos tales como alcoholes, acetona, acetato de etilo, eter, benceno, cloroformo, éter de petróleo.

25 3. La sustancia anticancerosa no es deslizable en agua a través de una membrana de celulosa regenerada (celofana).

30 4. La sustancia anticancerosa pierde su actividad anticancerosa cuando es calentada a una temperatura de 120°C durante 10 minutos en una solución acuosa neutra. Pierde su actividad a la temperatura ambiente en solución alcali-

327373



na.

5. La propiedad más característica de la sustancia anticancerosa es su actividad biológica anticancerosa. Cuando se inyecta en una dosis conveniente por vía intravenosa a ratones que tienen sarcomas intradérmicos bien desarrollados de Krockner /Sarcoma 180/ o carcinomas intradérmicos de Erlih, resulta de esto una necrosis del tumor bien marcada para casi todos los tumores y algunos días más tarde casi la mitad de los animales están completamente curados.

Estas propiedades permiten sacar la conclusión de que la sustancia anticancerosa es de constitución molecular simplemente compleja. Es diferente por sus cualidades a todos los agentes anticancerosos conocidos hasta ahora.

Numerosos análisis químicos de la sustancia anticancerosa han demostrado que ésta presenta una composición química compleja y que contiene también un ácido ribonucléico cuyas propiedades físicas y químicas podrían permitir caracterizar la sustancia anticancerosa.

El ácido ribonucléico que forma parte de la sustancia anticancerosa posee como sal de sodio, las propiedades características siguientes:

Contiene: carbono 33,35%; hidrógeno 4,43%; nitrógeno 13,70%; y fósforo 9,80%.

Este ácido ribonucléico muestra un máximo de absorción a 258 milimicras. Su espectro ultravioleta está representado en la Figura 2, mientras que su espectro infrarrojo está representado en la Figura 3.

Después de la hidrólisis, una cromatografía de los hidratos de carbono por medio de un sistema disolvente de butanol:propanol:agua = 1:1:1, muestra una mancha con RF

327373



0,35 que corresponde a la ribosa.

EJEMPLO 1

Se inocular *Lactobacillus bulgaricus* var. tumoro-
necroticans LB-51 en un medio nutritivo de 200 ml que
5 comprende 3% de extracto de levadura, 0,5% de peptona,
0,5% de extracto de carne, 0,5% de extracto de levadura,
0,5% de sacarosa y 0,1% de magnesio. El cultivo se efec-
túa a una temperatura de 37°C durante 24 horas. El pH del
cultivo es llevado a 6,5 y seguidamente el cultivo es cen-
10 trifugado a 5.000 g durante 30 minutos.

El líquido flotante o sobrenadante (1) es inyectado
a razón de 0,5 ml por vía intravenosa a ratones que tienen
un sarcoma 180 bien desarrollado, implantado por vía sub-
cutánea. No se obtiene ninguna necrosis del tumor en nin-
15 guno de los 20 ratones tratados. El sedimento de las célu-
las bacterianas (2) es molido con arena de cuarzo en un
mortero y es extraído con ayuda de 100 ml de agua destila-
da. La mezcla es centrifugada a 5.000 g, el líquido flotante
(3) es inyectado por vía intravenosa a ratones que tie-
20 nen el sarcoma 180, en una dosis de 0,5 ml. Después de 24
horas, se observa una necrosis del tumor en 17 ratones so-
bre 20 tratados y 10 días más tarde 8 ratones han sido cu-
rados completamente.

En las mismas condiciones experimentales, extractos
25 de las células bacterianas (3) obtenidas del *Lactobacillus*
casei, var. tumoro-necroticans núm. 17 acaban por provocar
necrosis en 14 ratones sobre 20 tratados, de los cuales
4 son curados completamente.

Extractos de *Lactobacillus helveticus*, var. tumoro-

327373



necroticans núm 31, provocan necrosis en 15 ratones sobre
20 tratados, de los cuales 5 son curados completamente.
Los extractos de Lactobacillus acidophilus, var. tumoronecroticans núm. 43, provocan respectivamente 12 necrosis
5 y 3 curaciones completas.

EJEMPLO 2

Lactobacillus bulgaricus var. tumoronecroticans
LB-51 es inoculado en un medio nutritivo de 1.200 litros
de la siguiente composición: Extracto de soja 3%; extrac-
10 to de carne 0,5%; peptona 0,5%; melaza 2% (Calculado como
azucar); sulfato de magnesio 0,1%; y 1.200 litros de agua
corriente. El cultivo se efectúa a 37°C durante 24 horas.
El pH del cultivo es regulado a 6,5 después de lo cual és-
te es centrifugado. El sedimento es lavado con 50 volume-
15 nes de solución fisiológica y es centrifugado nuevamente.
Se obtienen 14,200 g de células bacterianas naturales hú-
medas.

5,000 g de estas células bacterianas son diluidos
en 15.000 ml de agua y son desintegrados en un homogenei-
20 zador. El producto homogeneizado es centrifugado a 5.000
g y el líquido flotante (1) es separado. 10 ml de este
líquido son siluidos con agua destilada hasta una concen-
tración de 8 mg de la sustancia seca en 1 ml, y son inyec-
tados por vía intravenosa a ratones, que tienen sarcomas
25 de Krockner desarrollados, en una dosis de 0,5 ml Una ne-
crosis marcada del tumor aparece en 19 de los 20 ratones
tratados, de los cuales 12 han sido, como consecuencia,
completamente curados.

100 ml del líquido flotante (1) son liofilizados y
30

327373³¹



el análisis químico de la sustancia liofilizada indica la composición siguiente: Acido nucleico 9,5% y proteínas 70%.

EJEMPLO 3

5 3.000 ml del líquido flotante (1) del segundo ejemplo son añadidos a 6.000 ml de etanol al 96%. La mezcla es mantenida durante 2 horas a 4°C y después es centrifugada.

10 El líquido flotante es separado y el precipitado (3) es disuelto en 600 ml de agua y después es centrifugado para eliminar los residuos insolubles. La solución pura(4) es dividida en tres partes iguales para el trabajo ulterior.

15 200 ml de la solución (4) son acidificados con ácido clorhídrico hasta un pH de 2. El precipitado (5) es separado por centrifugación. El líquido flotante 6 es igualmente separado. El precipitado es lavado con etanol y con acetona y después es secado. Se obtienen 9,4 g de material seco. 30 mg de esta sustancia son disueltos el 15 ml de agua y después son inyectados por vía intravenosa a ratones que tienen sarcomas 180, en dosis de 0,5 ml. Las necrosis del tumor aparecen en 17 de los 18 ratones tratados, de los cuales 10 ratones han sido completamente curados como consecuencia. Los resultados del análisis muestran la presencia de 13,7% de ácido nucléico y de 74% de proteínas.

25

EJEMPLO 4

200 ml de la solución (4) del tercer ejemplo son mezclados con sulfato de amonio hasta una saturación de



o,4 y son puestos en frigorífico durante 2 horas a una temperatura de 4°C. La mezcla es centrifugada. El líquido flotante es separado y el precipitado es diluido en 50 ml de agua a un pH de 2 y después es nuevamente centrifugado. El líquido flotante es eliminado y el sedimento es disuelto en agua con adición de sosa hasta un pH de 7. La solución es sometida a una diálisis a través de "celofana" en agua corriente durante 18 horas para separarla. El líquido dializado es centrifugado para separar un pequeño resto no disuelto y después es liofilizado. Se obtienen 7,4 g de sustancia seca. El examen de la acción anticancerosa llevado a cabo de la misma manera que en el tercer ejemplo conduce a la necrosis del tumor en todos los 20 animales tratados, de los cuales 12 han sido completamente curados como consecuencia.

EJEMPLO 5

A 200 ml de la solución (4) del tercer ejemplo, se añaden 2 ml de una solución al 20% de cloruro de calcio. El precipitado (1) es separado por centrifugación. El líquido flotante (2) es acidificado con ácido clorhídrico hasta un pH de 2. El nuevo precipitado es separado por centrifugación y el líquido flotante (4) es eliminado. El precipitado /3/ es disuelto en agua con adición de sosa hasta un pH de 7. Después es sometido a liofilización. Se obtienen 3,2 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg por ratón conduce a la necrosis completa del tumor en todos los ratones tratados y que tienen un tumor. Los resultados del análisis muestran la presencia de 14,3% de ácido nucléico y 69% de proteínas.

327373

31



El precipitado (1) es diluido en 50 ml de agua y se añaden 3 g de "Amberlite". La mezcla es centrifugada y el líquido flotante es liofilizado. Se obtienen 7,4 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg por ratón de esta sustan-
5 `cia provoca profundas necrosis del tumor en todos los 20 animales tratados, de los cuales 11 han sido curados completamente.

Los resultados del análisis muestran la presencia de 11,9% de ácido nucléico y de 70% de proteínas.

1

10 EJEMPLO 6

1.000 ml del líquido flotante (1) del ejemplo 2 son acidificados con ácido clorhídrico a un pH 2. El precipitado es separado por centrifugación y disuelto en 100 ml de agua con adición de sosa hasta un pH 7. La solución es
15 mezclada con dos volúmenes de etanol al 96%. El precipitado es separado por centrifugación, después lavado con etanol y con acetona y secado. Se obtienen 7,2 g de sustancia
20 seca. Una dosis de 1 mg por ratón provoca la necrosis del tumor en los 20 animales tratados, de los cuales 13 han sido curados completamente. Los resultados del análisis de esta sustancia muestran la presencia de 10,8% de ácido nucléico y de 74% de proteínas.

EJEMPLO 7

A 1.000 ml del líquido flotante (1) del ejemplo
25 2, se añade sulfato de amonio hasta 0,4 de saturación. El precipitado es centrifugado y disuelto en agua, neutralizado. La solución es acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH de 2. El precipitado es disuelto en agua, neutra-



lizado hasta un pH 7 y después liofilizado. Se obtienen 8,2 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg por ratón conduce a la necrosis del tumor en los 18 ratones tratados, de los cuales 12 han sido completamente curados como consecuencia.

Los resultados del análisis indican 9,9% de ácido nucleico y 77% de proteínas.

EJEMPLO 8

A 1.000 ml del líquido flotante (1) del segundo ejemplo, se añaden 10 ml de solución al 20% de cloruro de calcio. El precipitado es centrifugado y disuelto en 100 ml de agua destilada. A esta suspensión se añaden 3 g de "Amberlite". Después de una agitación enérgica, la mezcla es centrifugada y el líquido flotante es liofilizado. Se obtienen 6,8 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg por ratón ha provocado una necrosis del tumor bien marcada en cada uno de los 24 ratones tratados, de los cuales 11 han sido completamente curados como consecuencia.

Los resultados del análisis muestran la presencia de 12% de ácido nucleico y de 69% de proteínas.

EJEMPLO 9

500 ml del líquido flotante (1) del segundo ejemplo son mezclados con 500 ml de fenol al 90%. La mezcla es agitada enérgicamente hasta una hora a una temperatura de 4°C y es centrifugada a 5.000 g durante 30 minutos. Las fases de agua y de fenol son separadas.

La fase de agua es acidificada por ácido clorhídrico hasta un pH 2. El precipitado es separado por centrifugación

327373

31



después lavado con etanol y con acetona y finalmente secado. Se obtienen 1,8 g de sustancia seca. Una dosis de 2 mg por ratón no ha provocado necrosis del tumor más que en 12 de los 20 ratones tratados, de los cuales solamente 5 han sido curados completamente.

A la fase de fenol se añade acetato de sodio hasta una concentración de 1%, después de lo cual se añaden 4 volúmenes de etanol. El precipitado es centrifugado, lavado con etanol y con acetona y después secado. Se obtienen 6,5 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg por ratón provoca la necrosis del tumor en los 20 animales tratados, de los cuales 12 han sido completamente curados como consecuencia.

Los resultados del análisis de esta sustancia muestran la presencia de 7,9% de ácido nucleico y de 84% de proteínas.

EJEMPLO 10

100 g de células bacterianas naturales húmedas que resultan del ejemplo 2 son mezclados con 1.000 ml de fenol al 90% recientemente destilado. La mezcla es agitada durante 1 hora a una temperatura de 10°C y después escentrifugada. La capa de fenol es separada. A 100 ml de esta capa se añade acetato de sodio (1%) y 4 volúmenes de etanol al 96%. El precipitado obtenido es centrifugado, lavado con etanol y con acetona y después es secado. Se obtienen 3,2 g de sustancia seca. Una dosis de 2 mg por ratón provoca una necrosis del tumor en los 20 ratones tratados, de los cuales 9 han sido completamente curados como consecuencia.

327373



EJEMPLO 11

Los 500 g de células bacterianas húmedas del ejemplo 2 son diluidos en 1.000 ml de agua y son añadidos seguidamente a 1.000 ml de fenol al 90%. La mezcla es agitada durante 1 hora a temperatura de 4°C y después es centrifugada durante 30 minutos a 5.000 g. La fase de agua (1) y la fase de fenol (2) son separadas.

A la fase acuosa se añade 1% de acetato de etilo y después 2 volúmenes de etanol. La mezcla es centrifugada. El líquido flotante (2) es eliminado. El precipitado (4) es disuelto en 50 ml de agua con adición de sosa para llevar el pH a 7. Después la solución es acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH 2. La mezcla es centrifugada. El líquido flotante (5) es separado y el precipitado (6) es disuelto de nuevo en 50 ml de agua con adición de sosa y después es acidificado con ácido clorhídrico hasta un pH 2 y es centrifugado. El líquido flotante es eliminado y el precipitado (8) es lavado con etanol y con acetona, y después es disuelto en 20 ml de agua con adición de sosa para llevar el pH a 7, y es liofilizado. Se obtienen 0,8 g de sustancia seca. Una dosis de 1 mg de esta sustancia por ratón provoca una necrosis completa del tumor en los 20 ratones tratados, habiendo sido curados completamente como consecuencia solamente 5.

La fase de fenol /2/ es precipitada con 4 volúmenes de etanol. El precipitado es lavado con etanol y con acetona y después es secado. Una dosis de 1 mg de esta sustancia por ratón ha provocado necrosis del tumor en los 22 ratones tratados, de los cuales 10 han sido completamente curados como consecuencia.

327373

31 M



EJEMPLO 12

10 g de células bacterianas liofilizadas son diluidos en 100 ml de agua. Se añadan a esto 100 mg de lizosima. La mezcla es agitada de manera continua durante 3 horas a una temperatura de 37°C y se obtiene una homogeneización completa. La mezcla es centrifugada a 10.000 g por una duración de una hora. El líquido flotante (1) es liofilizado. Una dosis de 2 mg por ratón provoca una necrosis del tumor en 17 de los 20 ratones tratados. El precipitado (2) es disuelto de nuevo en agua acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH 2 y se añaden 100 mg de pepsina. Se mantiene durante 1 hora más otra hora = 2 horas a 37°C y después la mezcla es centrifugada. El líquido flotante (3) es eliminado. El precipitado (4) es disuelto en agua neutralizada hasta un pH de 7. Después de una nueva centrifugación el precipitado (5) es separado mientras que el líquido flotante (6) es liofilizado.

El resultado fué una necrosis completa del tumor en todos los ratones tratados por inyección de una dosis de 1 mg.

EJEMPLO 13

4.800 g de células bacterianas naturales húmedas de *Lactobacillus bulgaricus* LB-51 son diluidos en 2.000 ml de clara de huevo añadiendo una solución salina que lleva el volumen total a 14.000 ml. La suspensión es sometida a una temperatura de 37°C y a una agitación continua durante 3 horas, después de lo cual esta mezcla (1) es acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH de 2.

A 1.000 ml de la mezcla (1) se añade un g de pepsina

327373³¹



na mezclando continuamente el total durante 4 horas y
manteniendolo a una temperatura de 37°C. Se lleva segui-
damente el pH a 7 con ayuda de sosa. Se le añade además
1 g de tripsina "Difco". El tratamiento con tripsina es
5 proseguido durante 12 horas a una temperatura de 37°C
agitando continuamente con adición de cloroformo.

500 ml de la mezcla así tratada son centrifugados
a 8.000 r.p.m: durante 30 minutos. El sedimento de los re-
suidos no digeridos completamente (2) es lavado con alco-
10 hol y después secado. Se han obtenido 5 g de sustancia se-
ca. El líquido flotante (3) es mezclado con un volumen i-
gual de alcohol. El precipitado obtenido es centrifugado
a 2.700 r.p.m. durante 15 minutos, y después éste (4) es
disuelto en una pequeña cantidad de agua y es liofilizado.
15 Se obtienen 3.500 mg de sustancia seca. El analisis ha mos-
trado la presencia de 62% de proteínas y de 13,54% de áci-
do nucléico.

Dosis de 4 mg inyectadas por vía intravenosa a ra-
tones que tienen sarcomas 180 bien desarrollados, han pro-
20 vocado necrosis profundas en los tumores de los 10 anima-
les tratados.

El líquido flotante (5) es mezclado con un volumen
igual de alcohol. Resulta de esto un nuevo precipitado.
Después de haber centrifugado a 2.700 r.p.m. durante 15
25 minutos el precipitado (6) es disuelto en una pequeña can-
tidad de agua y despues es liofilizado. Se obtienen 3.300
mg de sustancia seca cuyo análisis indica 29% de protei-
nas y 30,03% de ácido nucléico.

Una dosis de 4 mg inyectada por vía intravenosa a
30 ratones que tienen sarcomas 180 bien desarrollados, han

327373



provocado necrosis profundas del tumor en todos los 10 animales tratados.

EJEMPLO 14

5 13.000 ml de la mezcla (1) del ejemplo 13 son centrifugados a 8.000 r.p.m. durante 30 minutos. El líquido flotante (1) es separado. El precipitado (2) es sometido en tandas a un desengrasado por una mezcla de volúmenes iguales de alcohol y de éter. Después de evaporación del disolvente, se obtienen 544 g de sustancia seca (3).

10 EJEMPLO 15

15 10 g de la sustancia (3) del ejemplo 14 son diluidos en 100 ml de una solución salina. Después de haber acidificado la mezcla con ácido clorhídrico hasta un pH 2, se añaden 100 mg de pepsina. La mezcla es mantenida a una temperatura de 37°C durante 4 horas agitandola constantemente. Después es centrifugada a 2.700 r.p.m. durante 15 minutos. El líquido flotante (1) es separado. El precipitado (2) es disuelto en el volumen de partida de la solución salina y después es neutralizado hasta un pH 7, después de lo cual es centrifugado a 8.000 r.p.m. durante 20 30 minutos. El precipitado (3) de los residuos no digeridos es lavado con alcohol y después secado. Se obtienen 3900 mg de sustancia seca. El líquido flotante (4) es liofilizado. Resultan de esto 3.100 mg de sustancia seca cuyo análisis indica la presencia de 88% de proteínas y 25 10,09% de ácido nucléico.

Dosis de 2 mg inyectadas por vía intravenosa a ratones que tienen sarcomas 180 bien desarrolladas, ha pro-



vocado necrosis profundas en los tumores de 17 de los 20 animales tratados. 10 días más tarde, 9 animales estaban completamente curados.

EJEMPLO 16

5 10 g de la sustancia (3) del ejemplo 14 son diluidos en 100 ml de solución salina, se corrige el pH a 7 y se añaden 100 mg de tripsina "Difco". La mezcla es sometida a una temperatura de 37^oC agitándola enérgicamente durante 4 horas y después se la centrifuga a 2.700 r.p.m.

10 durante 15 minutos. El precipitado de los residuos no digeridos (1) es lavado con alcohol y después secado. Se obtienen 2.550 mg de sustancia seca.

 El líquido flotante (2) es mezclado con un volumen igual de alcohol. Resulta de esto un precipitado abundante.

15 El líquido flotante (3) es separado después de la centrifugación y el precipitado (4) es disuelto en agua y después liofilizado. Se obtienen 2.800 mg de sustancia seca cuyo análisis muestra la presencia de 92% de proteínas y 7% de ácido nucléico.

20 Dosis de 4 mg inyectadas en vía intravenosa en ratones que tienen sarcomas 180 bien desarrollados, han provocado necrosis profundas del tumor en 18 de los 20 animales tratados. 10 días más tarde, 10 animales estaban completamente curados.

EJEMPLO 17

25 10 g de la sustancia (3) del ejemplo 14 son diluidos en 100 ml de una solución salina. La mezcla es acidificada hasta un pH 2 con ácido clorhídrico y se le añaden

327373

31M



100 mg de pepsina. Después de un tratamiento de 4 horas a una temperatura de 37°C, la mezcla es neutralizada hasta un pH de 7 añadiéndole 100 mg de tripsina "Difco". La mezcla es mantenida denuevo a 37°C durante 4 horas y es centrifugada a 8.000 r.p.m. durante 30 minutos. El precipitado de los residuos no digeridos (1) es lavado con alcohol y secado. Se obtienen 1.350 mg de sustancia seca.

El líquido flotante (2) es mezclado con un volumen igual de alcohol y es centrifugado. El líquido flotante (3) es separado. Después de una disolución en un poco de agua, el precipitado es liofilizado. Se obtienen 2.200 mg de sustancia seca cuyo análisis deja observar la presencia de 68% de proteínas y 8,84% de ácido nucleico.

Una dosis de 2 mg inyectada por vía intravenosa a ratones que tienen sarcomas 180 bien desarrollados, ha provocado necrosis profundas del tumor en cada uno de los 20 animales tratados, y 10 días más tarde, 8 animales estaban curados.

EJEMPLO 18

1.500 mg de la fracción (4) del ejemplo 15 son disueltos en 45 ml de solución salina añadiéndoles 15 mg de tripsina reconstituida. La mezcla es mantenida a una temperatura de 37°C agitandola constantemente y efectuando la corrección periódica del pH a 7. Después de un tratamiento de 20 horas, la mezcla es centrifugada. El precipitado (1) de los cuerpos no digeridos es separado. Al líquido flotante (2) se añade cloruro de sodio hasta una concentración de 12%. Resulta de esto una sedimentación del precipitado que es centrifugado a 2.700 r.p.m. durante 30 minutos, y

327373



después el precipitado (3) es disuelto en agua y liofilizado. Se obtienen 400 mg de sustancia seca cuyo análisis muestra la presencia de 11% de proteínas y de 0,5% de ácido nucléico.

5 Incluso una dosis de 8 mg por ratón de esta sustancia, inyectada por vía intravenosa, no provoca ningún cambio de los tumores de los 20 ratones tratados.

10 Se añade 1/2 volumen de alcohol al líquido flotante(4). El precipitado obtenido es separado por centrifugación y después disuelto en poca agua y es liofilizado. Se obtienen 120 mg de sustancia seca (5) cuyo análisis muestra la presencia de 21% de proteínas y de 7,3% de ácido nucléico.

15 Una dosis de 4 mg inyectada por vía intravenosa a ratones que tienen sarcomas 180 bien desarrollados, ha provocado necrosis profundas del tumor 18 en los 20 animales tratados y 10 días más tarde, 8 animales estaban completamente curados.

EJEMPLO 19

20 5g de células bacterianas liofilizadas del *Lactobacillus bulgaricus* LB-51 son diluidos en 50 ml de solución salina cuyo pH es de 7. Se añaden a la mezcla 50 mg de lizosima. El tratamiento con la lizosima se efectúa a una temperatura de 37°C agitando continuamente durante 2 horas.
25 La mezcla es acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH 2 y se le añaden 50 mg de pepsina. Después de un tratamiento de 4 horas a una temperatura de 37°C, la mezcla es centrifugada a 2.700 r.p.m. durante 30 minutos. El líquido flotante es separado.

327373

31 MAR



5 El precipitado (2) es disuelto en una solución salina cuyo pH es de 7 y se le añaden 50 mg de tripsina "Difco". Después de un tratamiento de 4 horas a 37°C agitandolo de manera permanente, la mezcla es centrifugada a 2.700 r.p.m. durante 30 minutos. El precipitado de los residuos no digeridos (3) es lavado con alcohol y secado. Se obtienen 640 mg de sustancia seca.

10 El líquido flotante (4) es mezclado con un volumen igual de alcohol. Después de centrifugación de la mezcla, el precipitado (5) es disuelto en poca agua y es dializado a través de una membrana de celofana en agua corriente y después es liofilizado. Se obtienen 500 mg de sustancia seca cuyo análisis muestra la presencia de 37% de proteínas y 11,36% de ácido nucléico.

15 El líquido flotante (6) es mezclado con un volumen igual de alcohol y es centrifugado. El precipitado (7) es disuelto en poca agua y es sometido a una diálisis en agua corriente durante 24 horas y seguidamente es liofilizado. Se obtienen 80 mg de sustancia seca cuyo análisis muestra la presencia de 29% de proteínas y 41,24% de ácido nucléico.

20

Los precipitados (5) y (7) han mostrado, con una dosis de 4 mg por ratón, una fuerte acción de necrosis del tumor en los 20 ratones tratados.

25 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Bulgaria el 1 de Junio de 1.965, con el número 5091 y el 7 de Marzo de 1.966, con el número P-3, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un procedimiento de fabricación de una sustancia anticancerosa activa, caracterizado porque se cultiva un microorganismo del género *Lactobacillus*, cuyo microorganismo produce sustancia anticancerosa en el seno de sus cultivos y la acumula en las células bacterianas, y porque se extrae y purifica la sustancia anticancerosa.

10 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque dicho microorganismo pertenece a una de las especies *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*.

15 3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho microorganismo pertenece a una de las siguientes cepas: *Lactobacillus bulgaricus*, var. tumoronecroticans, LB-51, n^o 93 y n^o 100, *Lactobacillus helveticus*, var. tumoronecroticans n^o 31, *Lactobacillus acidophilus*, var. tumoronecroticans n^o 43.

20 4.- Un procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque dicho microorganismo es el *Lactobacillus bulgaricus*, var. tumoronecroticans LB-51.

25

327373

31 MAY



5.- Un procedimiento según la reivindicación 3
caracterizado porque el medio nutritivo para el cultivo
del microorganismo comprende al menos una de las siguien-
tes materias: Extracto de soja, peptona, extracto de leva-
5 dura, extracto de maiz, extracto de carne, glucosa, mal-
tosa, lactosa, sacarosa, dextrina y melaza, fosfatos or-
gánicos e inorgánicos y sulfato de magnesio.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 3, ca-
racterizado porque se efectua el cultivo prácticamente en
10 condiciones de anaerobiosis.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 6 ca-
racterizado porque se efectua el cultivo a una temperatu-
ra comprendida entre 28 y 50°C.

8.- Unprocedimiento según la reivindicación 1, ca-
15 racterizado porque se efectua la extracción de la sustan-
cia anticancerosa de los materiales procedentes del cul-
tivo aplicando al menos una vez una de las dos siguientes
operaciones: 1) Extracción por medio de un disolvente del
grupo que comprende agua y fenol, y 2) precipitación añá-
20 diendo al menos un miembro del grupo que comprende disol-
ventes orgánicos solubles en agua, sales y ácidos.

9.- Un procedimiento según la reivindicación 1, ca-
racterizado porque la sustancia anticancerosa está conte-
nida en al menos uno de los miembros del siguiente gru-
25 po: Celulas bacterianas naturales de bacilos del género
lactobacillus, celulas bacterianas de las que se han ex-
traido previamente los constituyentes y productos inertes
no activos, obtenidos durante la purificación química.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 8 ca-
30 racterizado porque se mezcla agua y el material que con-

327373

31 MAY



tiene la sustancia anticancerosa, y porque se filtra o centrifuga la mezcla y se separa el extracto acuoso.

5 11.- Un procedimiento según la reivindicación 9 caracterizado porque se mezclan dichos materiales con fenol, después se centrifuga la mezcla y se separa el extracto fenólico.

10 12.- Un procedimiento según la reivindicación 9 caracterizado porque se mezcla agua con dichas células bacterianas, porque se desintegran estas células bacterianas con un homogeneizador, un molino de colóides, ultrasonidos o enzimas, tales como la lisozima y pepsina, y porque se centrifuga la mezcla y se separa el extracto acuoso.

15 13.- Un procedimiento según la reivindicación 8 caracterizado porque se mezclan los materiales que contienen la sustancia anticancerosa con partes iguales de agua y de fenol, y se centrifuga la mezcla y se separa la capa de agua de la capa de fenol.

20 14.- Un procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se añaden disolventes orgánicos solubles en agua a las soluciones para precipitar la sustancia anticancerosa.

25 15.- Un procedimiento según la reivindicación 14 caracterizado porque dicho disolvente orgánico está constituido por al menos uno de los miembros del grupo que comprende metanol, etanol, propanol y acetona.

30 16.- Un procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se precipita esta sustancia desde los disolventes que la contienen, añadiendo diversas sales.

327373

21 M



17.- Un procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque dichas sales comprenden al menos uno de los miembros del grupo que comprende sulfato de amonio, sulfato de sodio, cloruro de bario, cloruro de calcio y sulfato de magnesio en combinación con ácido clorhídrico.

18.- Un procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se añade a dichos disolventes ácido hasta la obtención de un pH de aproximadamente 2.

19.- Un procedimiento según la reivindicación 17 caracterizado porque se separa el precipitado obtenido de las sales por diálisis a través de una membrana de celulosa regenerada en agua o bien por disolución del precipitado en agua y precipitación con ácidos o alcohol.

20.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se desintegran las células bacterianas de los bacilos del género lactobacillus con ayuda de clara de huevo y de enzimas que no tienen ninguna influencia química sobre la sustancia anticancerosa, pero eliminan los cuernos no activos de sustancia inerte que lo acompañan.

21.- Un procedimiento según la reivindicación 20 caracterizado porque dichas enzimas están constituidas por lisozima y enzimas proteolíticas..

22.- Un procedimiento según la reivindicación 21 caracterizado por la utilización de las enzimas en el orden de: clara de huevo o, lisozima-pepsina-tripsina-pepsina.

23.- Un procedimiento de fabricación de una sustancia anticancerosa activa.

327373

31 MAY



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

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

Madrid,

31 MAY. 1962

P.A.

Alberto de Escaburo
Por Poder

7373 A

T A B L A

C

3273

E S P E C I E S		L A C T O B A C I L L U S							
		Bulgaricus			Casei	Helveticus	Acidophilus		
C e p a		LB-51	LB-87	LB-93	LB-104	IC-17	IH-31	LA-43	
Observación microscópica	1	Bacilo	+5-19 μ	+5-19 μ	+7-12 μ	+5-15 μ	+5-8 μ	+5-12 μ	+4-15 μ
	2	Movilidad	-	-	-	-	-	-	-
	3	Endosporas	-	-	-	-	-	-	-
	4	Esporangio	-	-	-	-	-	-	-
	5	Coloración gram	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina es- tabilizada	6	Licuaación	-	-	-	-	-	-	-
Cultivo de leche a 32°C	7	Coagulación	+	+	+	+	+	+	+
		Reacción de la leche al panel tomasol	R	R	R	R	R	R	R
Cultivo favo- rable al de- sarrollo	8	Medio de cultivo número	11	11	11	11	11	11	11
Cultivo so- bre papilla de glucosa a 37°C	9	Turbidez	-	+	+	-	+	+	+
		Sedimento	+	+	+	+	+	+	+
Colonias so- bre glucosa agar cultiva- das a 37°C	10	Forma: descrita en el texto							
Cultivo in- clinado sobre glucosa-agar a 37°C	11	Desarrollo	+	++	+	+	+++	+	++
Cultivo sobre glucosa esta- bilizada a 37°C	12	Desarrollo	++	+++	++	++	++	++	++
	13	Reducción de nitratos							
	14	Catalasa	-	-	-	-	-	-	-
	15	Tempe- ratura 23-37°C de desa- rrollo 30-50°C 40-60°C	+	+	+	+	+	+	+
	B								
	16	Tempera- tura óp- tima de desarro- llo	25-37°C 30-40°C 32-45°C 35-50°C	+	+	+	+	+	+
	17	Orígeno requeri- do	Anaero- biosis	+	+	+	+	+	+
Propiedades fisiológi- cas.	18	Rotación óptica del ácido lácti- co	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	L(+)	DL	DL
	19	Azúcares disponi- bles	Glucosa Manosa Sacarosa Lactosa Maltosa Almidon Inulina Melecitosa	+	+	+	+	+	+
	20	Amino- ácido requerido	L-asparagin L-triptófan	+	+	+	+	+	+
	21	Vitami- na re- querida	Factor Bac. Bulgaricus	+	+	+	+	+	+

D

POOR
QUALITY

327313 A

T A B L A

C

3

E S P E C I E S	L A C T O B A C I L L U S							
	Bulgaricus		Casei	Helveticus	Acidophilus			
C e p a	LB-51	LB-87	LB-93	LB-104	IC-17	IH-31	IA-43	
1	Observación	+5-19 μ	+5-19 μ +7-12 μ	+5-15 μ	+5-8 μ	+5-12 μ	+4-15 μ	
2	microscópica	-	-	-	-	-	-	
3	Movilidad	-	-	-	-	-	-	
4	Medio de cultivo num. a 37°C durante 24 horas	-	-	-	-	-	-	
5	Esporangio	-	-	-	-	-	-	
6	Coloración gram	+	+	+	+	+	+	
7	Gelatina estabilizada	-	-	-	-	-	-	
8	Liccuación	-	-	-	-	-	-	
9	Cultivo de leche a 32°C	+	+	+	+	+	+	
10	Coagulación	R	R	R	R	R	R	
11	Reacción de la leche al papel tornasol	R	R	R	R	R	R	
12	Medio de cultivo número	ll	ll	ll	ll	ll	ll	
13	Cultivo favorable al desarrollo	ll	ll	ll	ll	ll	ll	
14	Turbidez	-	+	+	+	+	+	
15	Sedimento a 37°C	+	+	+	+	+	+	
16	Colonias sobre glucosa agar cultivadas a 37°C	Forma: descrita en el texto						
17	Cultivo clínico sobre glucosa-agar a 37°C	+	+++	+	+++	+	+++	
18	Cultivo sobre glucosa estabilizada a 37°C	+	+	+	+	+	+	

HOJA UNICA

24 JUN 1953

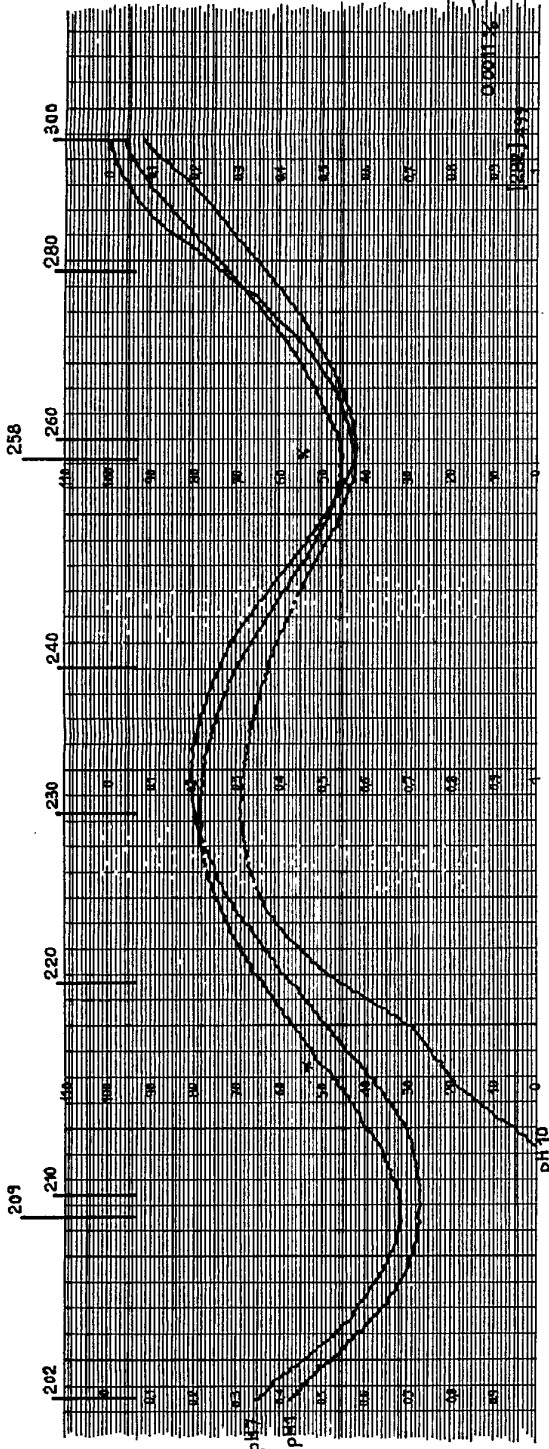


Fig: 2

327373

327373

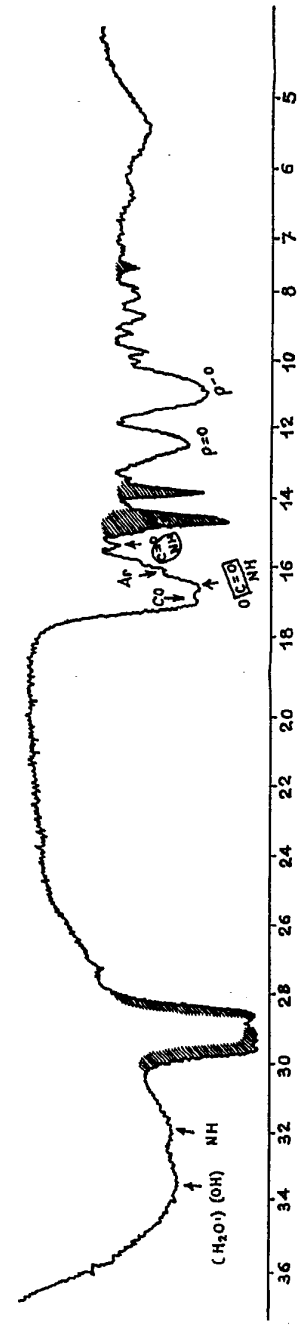


Fig: 1

ESCALA VARIABLE

Alfredo de Arriba
Director

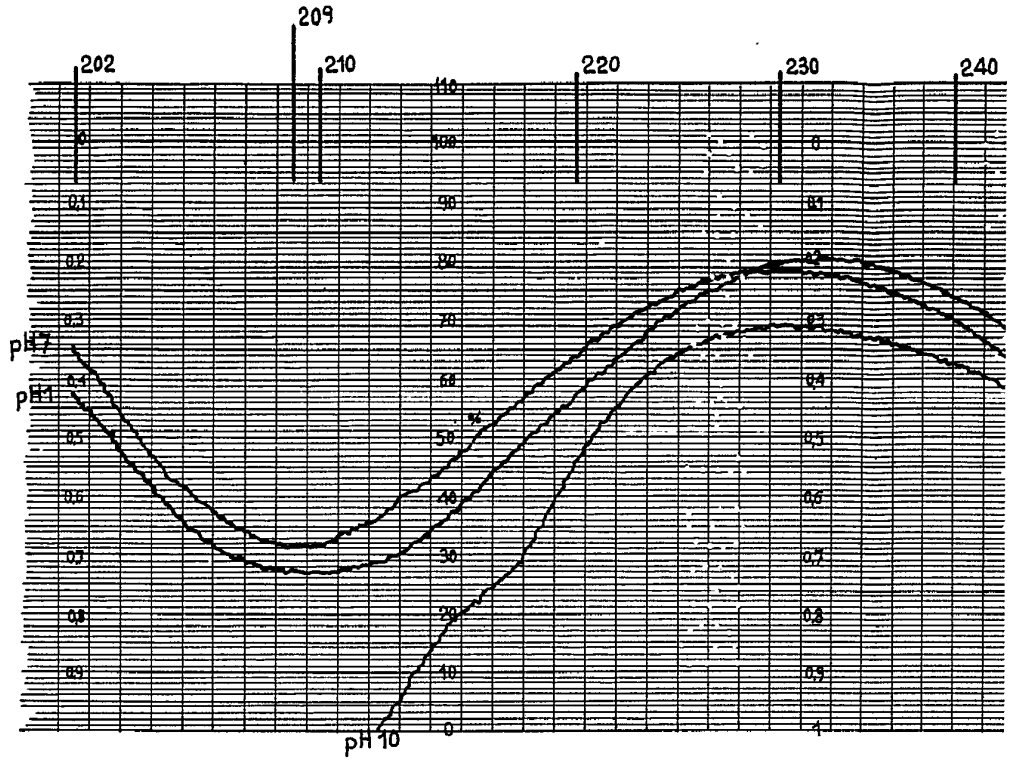


Fig. 2

327373

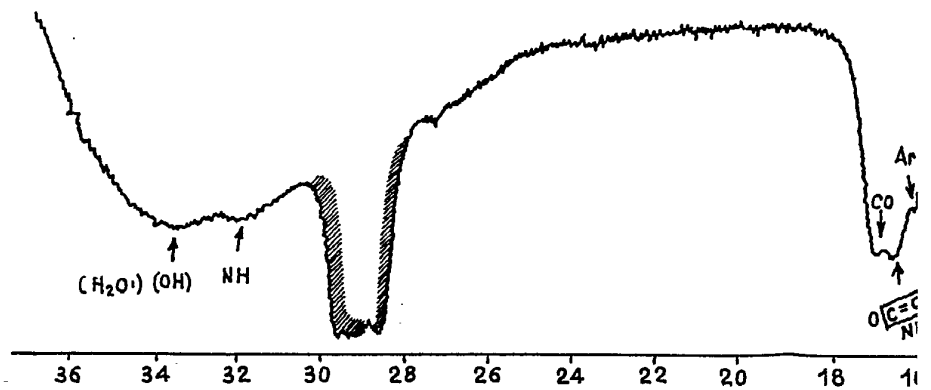


Fig. 1

ESCALA VARIABLE

24

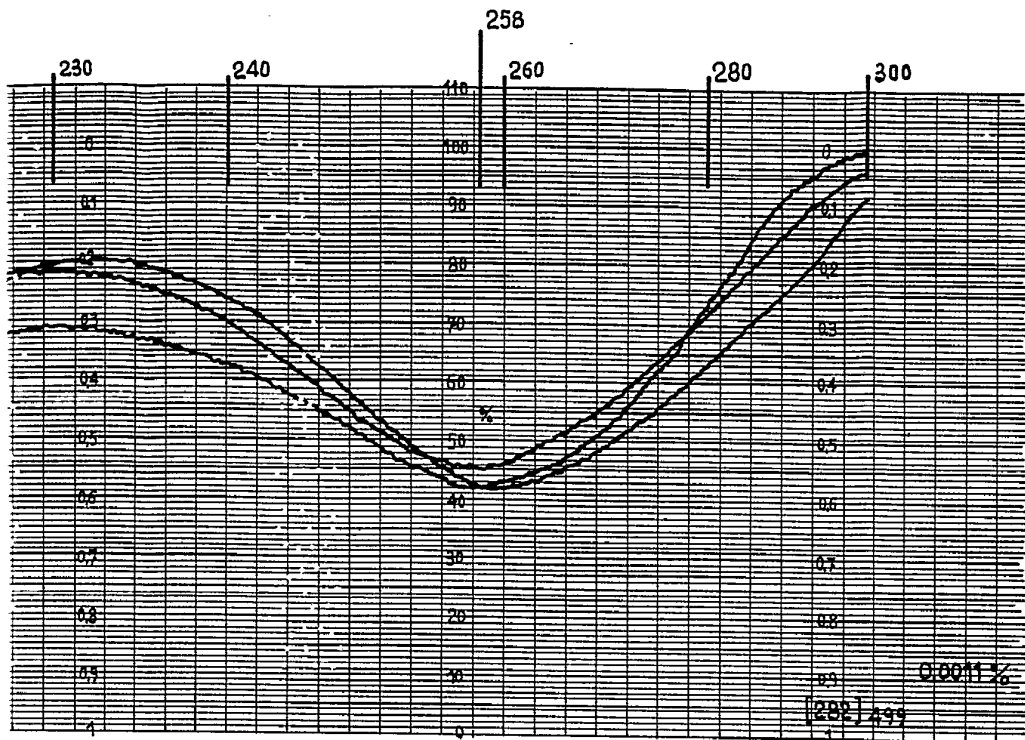


Fig: 2

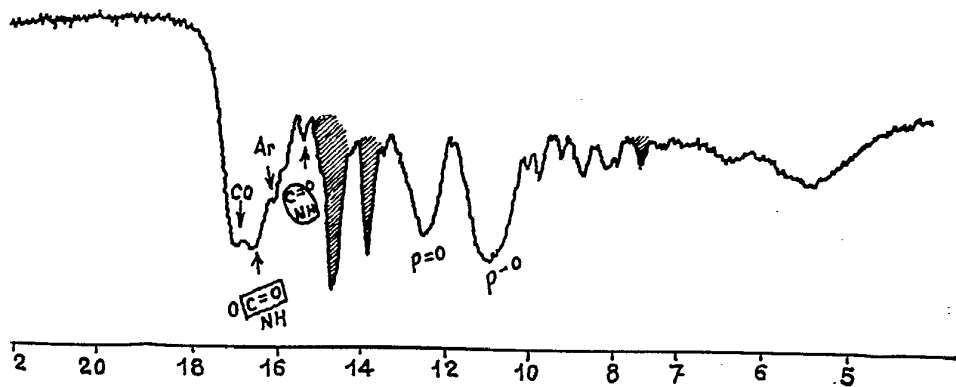


Fig: 1

327373

Alberto de Ezeabua
Por Favor