

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11	NUMERO	10 A2
	21	4 5 2 6 5 0 2	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		6-10-1976	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos consignados en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(22) CERTIFICADO DE ADICION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
1975 / nº4503	6/10/76	DINAMARCA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	61 PATENTE A LA CUAL SE ADICIONA
	A61k	

64 TITULO DE LA INVENCIÓN "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 451.109, por METODO DE OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL CANCER". Solicitud que se acoge a la modalidad prevista en el Artículo 47 del Estatuto.

71 SOLICITANTE (S)  
Dr. Kurt Bakgaard Oster.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
HOLTE (DINAMARCA).

72 INVENTOR (ES)  
el propio solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE  
D. Juan B. Renter Ridaura  
Barcelona, calle Consejo de Ciento, nº 347.

POOR  
QUALITY

La presente solicitud tiene por objeto el descubrimiento de unas proteínas asociadas al cáncer humano llamada, C1 IAC y CAAC, los procedimientos para su aislamiento y para su caracterización, y los reactivos para establecer un diagnóstico basado en el principio de la puesta en evidencia de la presencia de la C1 IAC y CAAC de los anticuerpos y antisueros presentando una especificidad frente a la C1 IAC y CAAC, la preparación de estos anticuerpos y de composiciones que los incluyen, de anticuerpos inmovilizados en una matriz y el tratamiento del cáncer humano mediante la utilización de estos antisueros o anticuerpos presentando una especificidad frente a la C1 IAC y CAAC.

La esencia de esta importante invención se basa en el principio de la utilización de anticuerpos dirigidos de un modo específico contra las proteínas bloqueantes y encubridoras, en especial la C1 IAC, asociadas a las afecciones cancerosas del hombre y presentes sobre las membranas de las células cancerosas.

De acuerdo con la invención, se utiliza este principio para tratar el cáncer in vivo y para efectuar el tratamiento extracorporal del suero de un paciente canceroso.

La C1 IAC es una proteína asociada al cáncer del hombre que puede aislarse de los humores de los pacientes cancerosos, incluyendo el suero a partir de las células malignas de los cánceres humanos, así como a partir de cultivos celulares. Repitiendo ciclos de cultivo y recolección de células, se ha aislado la C1 IAC de los medios de cultivo, lo cual indica que las propias células cancerosas son capaces de producir la C1 IAC.

La C1 IAC demostró poseer propiedades biológicas comparables o similares a las del inactivador del componente C1 del complemento humano (que se llama igualmente "inhibidor de la C1 esterasa") que es una  $\Delta_2$  neuramino glicoproteína que se encuentra en los humores de distintas especies, incluyendo el del hombre (Pensky y col., J. Biol.Chem., 236, 1674, 1961), pero que no es idéntica, en lo que respecta a la química de las proteínas, al

inactivador del componente C1 del complemento humano.

35 A partir de este momento a continuación, llamaremos "C1 IA" al inactivador del componente C1 del complemento humano (inhibidor de la C1 esterasa), mientras que se empleará el término "inactivador de la C1" para designar el grupo constituido por la C1 IAC y la C1 IA.

40 La C1 IAC demostró poseer propiedades biológicas parecidas a las propiedades de la C1 IA, incluyendo el efecto de inhibición sobre la activación inicial por el componente C1 del complemento humano de C4 y C2. Según el principio en el cual se basa la invención, parece que estos efectos inhibidores de la C1 IAC juegan un  
45 papel importante en la defensa de las células cancerosas contra la destrucción por el sistema inmune humano.

Se ha descrito por el propio solicitante de la Patente la presencia de una proteína parecida a la C1 IA sobre las membranas de las células cancerosas humanas (véase, por ejemplo Osher, K.,  
50 the Lancet, 2 de Marzo 1974, pág. 359, Osher, K., Linnemann, R., Acta path. micorbiol. scand. 1973, 81, pág. 365).

Según la invención, se aisló y caracterizó esta proteína parecida a la C1 IA asociada al cáncer humano, y como se indicó anteriormente, se descubrió que constituía una proteína nueva que  
55 no es idéntica a la C1 IA. Importantes realizaciones están basadas en estos descubrimientos.

La C1 IAC es una  $\text{D}_2$  neuraminoglucoproteína que posee una constante de sedimentación  $S^{20w} = 6,2$  S. La caracterización completa de la C1 IAC que la distingue de la C1 IA y de otras proteínas conocidas figura en la parte presentada a continuación bajo el título "Caracterización de la C1 IAC. Por enfoque isoeléctrico sobre LKB Multiphor, se observan dos bandas separadas por enfoque en un compuesto de tipo anfolina de la C1 IA y de la  
60 C1 IAC purificadas, el compuesto de tipo anfolina siendo una placa de PAG utilizada para el electroenfoque en capa fina sobre gel de poliacrilamida, con una gradiente de pH comprendido entre 4,0  
65

y 8,6, trabajando durante 2 horas enfriando a 0° C. con una tensión de 500 Voltios y una corriente de 50 miliamperios. Después de la electroforesis, se recorta el gel de poliacrilamida y se  
70 coloca siguiendo un ángulo de 90° en relación a un gel de agarosa al 2% en un tampón veronal con una fuerza iónica de 0,02, a un pH de 8,6 a 18° C. durante 12 horas, conteniendo este gel de agarosa anti-C1 IA humano de conejo.

Se obtienen de este modo dos líneas de precipitación que no  
75 se cruzan, mientras que en pruebas idénticas, utilizando un antisuero oligoespecífico dirigido al mismo tiempo contra la C1 IA y la C1 IAC, preparado sobre cerdo "Dansk Landrace" ("Danish Landrace"), un cerdo obtenido mediante el cruce de la raza Yorkshire con la raza "Dansk Landrace", o del carnero del tipo Texel ("Jysk Hederace"),  
80 se obtienen dos líneas de precipitación que se cruzan.

Ello muestra que, bajo el punto de vista inmunológico, el conejo no es capaz de establecer la diferencia entre la C1 IA y la C1 IAC, mientras que los otros animales que mencionamos son capaces de reconocer que las dos proteínas solamente son parcialmente  
85 idénticas. El hecho de que el antisuero de conejo no sea capaz de establecer la diferencia entre la C1 IAC y la C1 IA juega un importante papel en la invención y merece pues que se ponga de relieve.

En el desarrollo de la descripción, es importante recordar  
90 que una respuesta en pruebas inmunológicas basadas sobre la reacción con el anti-C1 IA humano de conejo (que es un reactivo existente en el mercado) constituye una respuesta relativa al "inactivador de la C1", o sea, en otras palabras, una respuesta a la suma de la C1 IAC con la C1 IA.

95 Se pueden utilizar varias técnicas para aislar y purificar la C1 IAC. Todas las técnicas utilizables presentan la característica común de constituir técnicas de separación destinadas al aislamiento y a la purificación de una materia de tipo pseudoglobulina, que posee las propiedades descritas bajo el título "Ca-

100 racterísticas de la C1 IAC", a partir del medio donde esta se  
encuentra. Las técnicas adecuadas utilizan métodos de absorción  
y de filtración sobre gel, las cuales son bien conocidas de los  
especialistas.

105 Como hemos demostrado que se puede preparar la C1 IAC a par-  
tir del medio de cultivo de estas células cancerosas humanas, una  
técnica que no se presta a ningún equívoco para concentrar, ais-  
lar y purificar la C1 IAC consiste en utilizar técnicas de absor-  
ción y de filtración sobre gel con una determinación inmunológica  
concomitante utilizando al anti-C1 IA humano de conejo para obte-  
110 ner, a partir de los medios de cultivo de las células cancerosas  
del tipo ya referido, una proteína reaccionando bajo el punto de  
vista inmunológico con el anti-C1 humano de conejo.

115 En estas operaciones, hay que tener el cuidado de evitar pH  
inferiores al 5,5 y superiores al 10,5 y de calentar a temperatu-  
ras superiores a los 56° C., pues hemos verificado (véase el apar-  
tado "Caracterización de la C1 IAC"), que estas condiciones alte-  
ran las propiedades biológicas de la C1 IAC. A fin de poner a pun-  
to una técnica adecuada de concentración y purificación de la  
C1 IAC, el especialista utilizará igualmente otras característi-  
120 cas que se indican bajo el título "Caracterización de la C1 IAC",  
como son el peso molecular calculado de la C1 IAC, que es de  
110 000 a 130 000. Podemos poner de relieve la presencia de la  
C1 IAC en cualquier materia utilizando pruebas inmunológicas con  
anticuerpos o antisueros reaccionando con la C1 IAC; esta reacción  
125 es fácil de distinguir de las reacciones obtenidas con otras pro-  
teínas, incluyendo la C1 Ia. Más adelante se describe la prepara-  
ción de estos anticuerpos o antisueros. Las técnicas adecuadas de  
concentración, de aislamiento y de purificación de la C1 IA uti-  
lizan técnicas cromatográficas por absorción sobre la columna y  
130 de filtración sobre gel.

Conviene hacer constar que hemos comprobado que la C1 IA y  
la C1 IAC no reaccionan con los anticuerpos presentando una es-

135 especificidad frente a otros antígenos conocidos, y en especial no reaccionan con los anticuerpos dirigidos contra los antígenos oncofetales y, de modo especial, con los antígenos dirigidos contra la  $\alpha_1$  fetoproteína o la proteína GEA.

140 Una técnica de preparación preferida del C1 IAC a partir de un medio que la contenga se describe bajo el título "Preparación de la C1 IAC", e incluye una cromatografía de absorción sobre columna seguida de una filtración sobre gel. Preferimos como columna para efectuar la cromatografía de absorción sobre columna, una resina cambiadora de aniones, (como la Dowex 2 x 8), en granos que midan 38 a 74 micras y un gel preferible para la filtración sobre gel es un gel de dextrano (como el Séphadex G 75 Superfino). Esta preparación utiliza igualmente técnicas clásicas, como la diálisis y la liofilización que se efectúa en los estadios apropiados.

150 El medio a partir del cual se concentra, aísla y purifica la C1 IAC puede ser un medio de cultivo de células cancerosas humanas productoras de C1 IAC, o un humor como el suero o un derrame pleural o la ascitis de un paciente portador de un cáncer productor de C1 IAC. Como ya hemos indicado, el medio de cultivo de las células cancerosas no contiene C1 IA, mientras que encontramos la C1 IA asociada a la C1 IAC en los humores de los pacientes humanos cancerosos. En la mayor parte de las utilidades prácticas de la C1 IAC, la presencia de C1 IA en el medio de partida utilizado no plantea ningún problema grave, puesto que los aislados conteniendo C1 IA además de C1 IAC son útiles de por sí, como se indica más adelante.

160 Para cultivar células cancerosas para producir C1 IAC, puede utilizarse el medio mínimo esencial de Eagle y el medio sintético RPMI conteniendo aminoácidos o bien puede igualmente utilizarse cualquier otro medio que permite cultivar las células cancerosas. Se ha comprobado que se obtienen los mejores rendimientos en C1 IAC cuando al medio de cultivo se añade, una cantidad de glutamina superior a cerca de 285 mg/l, y preferente-

165

nente que sea superior a 290 mg/l. En la práctica, la cantidad óptima de glutamina añadida es de cerca de 294 mg/l, y la adición de mayores cantidades no parece aportar ventajas adicionales.

170 Las técnicas habituales de cultivo de células cancerosas utilizan una fase de crecimiento en el medio esencial mínimo de Eagle enriquecido con glutamina y una fase de producción en el medio RPMI enriquecido con glutamina. Cada fase puede durar algunos días, por ejemplo de 3 a 7 días; en la práctica se prefieren 3  
175 días.

Como hemos indicado antes, la C1 IAC parece jugar un papel importante en la defensa de las células cancerosas contra la destrucción por el sistema inmune humano. La C1 IAC, posee una débil antigenicidad, y parece que la C1 IAC, con las otras proteínas  
180 que encontramos en los medios de cultivo de las células cancerosas y en los humores de los pacientes cancerosos, en especial la oronomucoide, la  $\alpha_2$ HS glicoproteína y la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína "ocultan" las células cancerosas en la identificación como "no propio" por el sistema inmune humano. Además, como ya hemos dicho,  
185 la C1 IAC es capaz de inhibir la activación de C4 por C1, y parece que reside aquí uno de los motivos principales que explican el hecho de que las células cancerosas no sean atacadas de modo eficaz por el sistema inmune.

Para una mejor comprensión del objeto de esta solicitud de  
190 Patente de Invención, se incluyen dibujos que representan esquemáticamente distintas fases del procedimiento y diversas pruebas efectuadas en relación con el mismo.

Dichos dibujos muestran:

195 Fig. 1.- Representa esquemáticamente el sistema complementario humano y la acción de bloqueo y de inhibición del inactivador de C1.

Fig. 2.- Representa los resultados de experiencias testigo de suero de sujetos sanos, sujetos padeciendo afecciones benignas

confirmadas y sujetos padeciendo afecciones cancerosas.

200 Fig. 3.- Ejemplo típico de inmunodifusión o exámen de suero de acuerdo con la técnica de Ouchterlony.

205 Fig. 4.- Ilustra un sistema de diagnóstico que incluye el anti-C1 IAC humano, utilizado de modo que la reacción inmunológica con C1 IAC sea fácilmente distinguible de toda respuesta a la C1 IA, dando además indicación de nivel de C1 y de C4 en la muestra.

Fig. 5.- Muestra un registro espectrofotométrico típico de una solución por tampón de Tris.

210 Fig. 6.- Muestra un registro espectrofotométrico típico de la densidad óptica del efluente.

Fig. 7.- Muestra una agregación por inmunoelectroforesis de C1 IAC purificado en un Gel conteniendo 2% de anti-C1 IAC humano de conejo.

215 Fig. 8.- Determinación de C4 C3 y C1 IAC de las diluciones en serie por inmunoelectroforesis de huso.

Fig. 9.- Inmunoelectroforesis de anti-C1 IA humano de conejo según Grabar-Scheidegger. El precipitado de C1 IAC se extiende en la zona B cuando se efectúa la inmunoelectroforesis en presencia de lactato de calcio.

220 Fig. 10.- Muestra que la C1 IAC tratada por la neuraminidasa, por inmunoelectroforesis, según Grabar-Scheidegger, no da precipitado.

225 Fig. 11 y 12.- Son representaciones de inmunoelectroforesis cruzada en tandem, según Kröll, que demuestra identidad total entre C1 IAC y C1 IA.

Fig. 13.- Muestra el efecto de la neuraminidasa sobre las propiedades inmunológicas de la C1 IAC, por inmunoelectroforesis cruzada en tandem con anti-C1 IA humano de conejo. La curva obtenida corresponde a la C1 IAC.

230 Fig. 14.- Inmunoelectroforesis cruzada según Fremán, que permite obtener precipitados idénticos con C1 IA purificada y

C1 IAC purificada.

Fig. 15.- Muestra unas extrapolaciones a distintas concentraciones.

235 Fig. 16.- Muestra la resultante fotográfica de las fases 4,6 y 8 de la 1ª experiencia (tiempos 10, 410 y 810 segundos).

Fig. 17.- Muestra la resultante fotográfica de las fases 7,9 y 11 de la 2ª experiencia a  $t = 0$  seg., tomada durante la aceleración a 30.000 r.p.m. y a  $T = 1206$  seg. y 1608 seg.

240 Fig. 18.- Muestra la resultante fotográfica a  $t < 0$  seg., tomada durante la aceleración a 30.000 r.p.m. y a tiempo 1206 seg. y 1608 seg. respectivamente.

Fig. 19.- Representa un gráfico de las distribuciones medias de medidas de inmunofluorescencia sobre cultivos de células de carcinomas.

245

Fig. 20.- Muestra un ejemplo de una gráfica de primera elución sobre Whatman DE-52.

Fig. 21.- Muestra un ejemplo de inmunoelectroforesis de hu-  
sada frente al antiorosenucido al 2%.

250 Fig. 22.- Muestra una unidad o central de desbloqueo.

La Figura 1 representa esquemáticamente el sistema complementario humano y la acción de bloqueo y de inhibición del inactivador del C1. Cuando una reacción complementaria fué atraída por el fragmento  $F_c$  de una inmunoglobulina, la C1 activada, con ocasión de una reacción o cascada complementaria normal, activa el componente C4 y C2 del complemento y la reacción prosigue hasta el punto final con una lisis de la materia "no propia" o del antígeno con el cual reaccionó la inmunoglobulina, pero el inactivador del C1 puede inhibir la activación de C4 por C1, en cuyo caso C4 no está fijado al antígeno, y las reacciones complementarias posteriores no se efectúan.

255

260

Los humores de los seres humanos sanos contienen C1 IA como regulador obligatorio del sistema complementario, pero en tan baja concentración que el sistema complementario es capaz de ejer-

265 cer la necesaria acción destructiva contra los elementos "no pro-  
pios", en un organismo sano, pero en el caso de ciertas enferme-  
dades, incluyendo afecciones víricas y cáncer la concentración  
de inactivador C1 se ha comprobado que es anormalmente alta, y  
basándonos en el descubrimiento propio de esta patente, es pre-  
270 sumible que en el caso de cáncer los niveles anormalmente altos  
de C1 se deben a la presencia de C1 IAC.

Para evaluar en qué medida los pacientes portadores de un  
cáncer confirmado poseen contenidos elevados de inactivador del  
C1 (C1 IA + C1 IAC), se estudió la concentración sérica del inac-  
275 tivador del C1, según la técnica "rocket" de Laurell con anti-C1  
IA humano de conejo, en cien pacientes portadores de cánceres de  
distintos orígenes, como carcinomas, sarcomas, linfomas y leuce-  
mias. En las experiencias testigo, se estudió de un modo idéntico,  
el suero de sujetos sanos y de sujetos padeciendo de afecciones  
280 benignas confirmadas. Los resultados están ilustrados en la Figu-  
ra 2. Vemos que los valores medios del inactivador de C1 de los  
sujetos sanos son bastante inferiores a aquellos de los pacientes  
portadores de un cáncer. Además, los pacientes sufriendo de en-  
fermedades no malignas poseen contenidos de inactivador de C1 cu-  
285 yos valores medios son bastante inferiores a aquellos de los pa-  
cientes cancerosos y que están cercanos a la escala normal. Pare-  
ce que la elevación de la concentración del inactivador del C1  
en el suero de los pacientes afectados de cáncer sea esencialmen-  
te debida a la presencia de la C1 IAC liberada por las colonias  
290 de células cancerosas. Se ha verificado, según la técnica de  
Ouchterlony que en los cancerosos teniendo elevados contenidos de  
inactivador del C1, se observan líneas de precipitación para la  
C1 IA y la C1 IAC, mientras que para los pacientes portadores de  
afecciones no malignas y para los sujetos sanos no se verifica la  
295 presencia de C1 IAC (las dos determinaciones habiendo sido efec-  
tuadas con anti-C1 IA/C1 IAC humano de carnero oligoespecífico).  
Un ejemplo típico de exámen del suero de acuerdo con la técnica

de Ouchterlony de este tipo, viene ilustrado en la Figura 3.

300 La evaluación del contenido del componente C4 de complemento, efectuada sobre los mismos grupos de pacientes, presenta casi los mismos valores medios para los sujetos sanos y los pacientes afectados de enfermedades no malignas, mientras que los pacientes afectados de cáncer tienen contenidos netamente superiores de C4, como lo muestra la Figura 2.

305 Se ha constatado que los valores del "inactivador del C1" (C1 IA + C1 IAC) superiores a cerca de 50 mg% (50 mg/100 ML) (estos valores habiendo sido determinados por electroforesis del tipo "rocket" con anti-C1 IA humano de conejo) coinciden muchas veces con una elevación de C4, lo cual indica que el sistema complementario está bloqueado en el estadio C4, o sea en el  
310 estadio en el cual la activación de C4 por C1 debería producirse con un consumo concomitante de C4 (C4 activado quedando fijado a las membranas de células a lisis por el sistema complementario). Estudios efectuados sobre cánceres de evolución progresiva  
315 han demostrado que el inactivador del C1 y del C4 se elevan continuamente hasta la muerte del paciente.

Asimismo se ha constatado que los valores en fase subterminal y terminales del C4 alcanzan hasta 160 mg%, y que los valores del inactivador de C1 alcanzan cerca de 120 mg%. En el suero de  
320 ciertos pacientes afectados de cáncer confirmado, con pequeñas colonias de células cancerosas primarias, se han obtenido valores de cerca de 40 a 50 mg% de inactivador de C1 (C1 IA + C1 IAC) sin ningún signo de elevación anormal de los contenidos de C4. No obstante, cuando estos pacientes han sufrido una intervención  
325 quirúrgica, los contenidos del inactivador de C1, bien disminuyen después de un período de cerca de 3 semanas y se mantienen en la escala normal, mientras que de un modo concomitante el C4 queda en la escala normal (lo cual indica que la intervención radical fué coronada de éxito), o bien se produce una elevación de inactivador C1 al mismo tiempo que del C4. La explicación de este  
330

último fenómeno puede estar en el hecho de que una intervención radical pueda haber provocado una elevación de la concentración sérica del inactivador de C1 por liberación de C1 IAC por las células cancerosas dañadas y por células cancerosas arrastradas por la circulación sanguínea produciendo este aumento de la concentración del inactivador de C1 un aumento de los niveles de C4 que muchas veces asciende incluso a los niveles anteriores a la intervención quirúrgica. En este caso el nivel de inactivador C1 está casi estacionario, pero es más alto que los valores normales durante un cierto período de tiempo después del cual se aprecia un nuevo incremento. El aumento de C4 concomitante con el incremento de inactivador C1 puede ser debido a la producción de anticuerpos del organismo contra componentes de células cancerosas liberadas. No obstante los anticuerpos aunque quizás sean capaces de combinar con componentes de células cancerosas liberadas, no darán lugar a una reacción complementaria o en cascada a causa de la acción bloqueadora de la C1 IAC, liberada, que junto con la concentración de C1 IA normal en el suero da lugar al aumento de nivel del inactivador C1 después de la intervención quirúrgica (las células afectadas por irradiación también pueden aumentar la liberación de C1 IAC, con el mismo efecto) y una recaída es lo que suele ocurrir en estos casos.

Apoyándose en la explicación anterior, vemos que se puede obtener un importante aumento de las probabilidades de un eficaz tratamiento del cáncer, neutralizando la inhibición de la respuesta inmune que se produce con ocasión de un cáncer, o sea suprimiendo el bloqueo de la defensa inmune, "destapando" las células cancerosas de forma que estas sean más fácilmente reconocidas por la inmunovigilancia del sistema inmune humano. La intervención permite obtener este desbloqueo y este "desenmascaramiento".

Como hemos indicado anteriormente, el sistema inmune de ciertos animales, incluyendo las razas y los tipos de cerdos y de carneros a los cuales hemos hecho referencia, es capaz de es-

365 tablecer la distinción entre la C1 IA humana y la C1 IAC humana cuando se introducen en forma de antígenos en el organismo del animal y es capaz de producir anticuerpos poseyendo determinantes que presentan una especificidad frente a la C1 IAC. Por tanto un aspecto importante de la invención tiene por objeto los  
370 antisueros o anticuerpos que presentan una especificidad frente a la C1 IAC. Podemos producir estos antisueros inmunizando animales susceptibles de inmunización selectiva, como son los cerdos y los carneros, correspondiendo por ejemplo a los tipos y a las razas a que aludimos antes, con vacunas conteniendo C1 IAC como compuesto antigénico, y recogiendo el suero de los animales inmunizados. Sabiendo que la orosmucoide, la  $\alpha_2$  HS glicoproteína y la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína son proteínas que se pueden aislar de  
375 medios de cultivo de células cancerosas, en especial en los estadios iniciales del cultivo (antes de la tripsinización y el trasplante), que estas tres proteínas son conocidas como poseedoras de una antigenicidad muy débil, y que la orosmucoide está presente en concentraciones elevadas en los exudados pleurales de los pacientes cancerosos, podemos pensar que estas tres proteínas participan en el "enmascaramiento" de las células cancerosas y por este motivo preferimos igualmente incorporar estas tres proteínas a la vacuna que administramos a los animales huéspedes para preparar los antisueros útiles para el tratamiento del cáncer, de tal forma que estos antisueros contengan igualmente anticuerpos dirigidos contra estas tres proteínas. Además, dado que el nivel inactivador C1 se considera que es uno de los principales  
380 factores responsables por el hecho de que las células de cáncer no son efectivamente atacadas por el sistema de inmunidad humano, es preferible incluir C1 IA en las vacunas para los animales huéspedes, con el fin de que los antisueros contengan también anticuerpos específicos a C1 IA. Como no podemos impedir que la  
385 C1 IA sea en muchos casos el inactivador predominante del C1 en los humores, mientras que la C1 IAC es el inactivador de C1 pre-

sente en las células cancerosas, es lógico suponer que el antisuero más eficaz es aquél capaz de atacar al mismo tiempo la C1 IAC y la C1 IA.

400 A continuación pasamos a exponer con más detalle el efecto de los antisueros o de los anticuerpos relacionados con la invención. Para simplificar, empleamos la abreviatura "INA" (antisuero inmune de neutralización y de desbloqueo) para designar al mismo tiempo los antisueros que poseen una especificidad frente a C1 IAC y eventualmente frente a C1 IA, de la cromomucoide, de la  $\text{O}_2$  HS glicoproteína y de la Zn  $\text{O}_3$  glicoproteína, así como las fracciones de inmunoglobulina correspondiente, más concentrada y purificada.

410 Los anticuerpos INA anti-C1 IAC humanos reaccionan con la C1 IAC sobre la membrana de las células cancerosas, según una reacción antígeno-anticuerpo. Por ejemplo, podemos poner de relieve la interacción entre el INA y las células cancerosas marcando el INA (por ejemplo con isotiocianato de fluoresceína) e incubando las células cancerosas humanas con el INA marcado.

415 Las células cancerosas presentan un marcaje positivo. Las células del mismo cultivo preincubadas con neuraminidasa no presentan ningún marcaje después de la incubación con el antisuero INA marcado, lo cual indica que las determinantes antigénicas de la C1 IAC son descompuestas por la neuraminidasa.

420 Cuando el INA bloquea las determinantes de la C1 IAC sobre las membranas de las células cancerosas, las células cancerosas se vuelven accesibles al ataque por el sistema de defensa inmune humoral humano, lo cual se puede poner en evidencia, por ejemplo, del modo siguiente: se incuban células cancerosas humanas con  
425 INA, después se incuban con el suero del mismo paciente o de otros pacientes afectados del mismo tipo de cáncer. Después de una incubación de por ejemplo 6 horas, las células cancerosas se desprenden del frasco de cultivo, y pasadas 18 horas, por ejemplo, todas las células cancerosas están muertas. Las células

430 de mesotelio y los fibroblastos tratados del mismo modo continúan  
desarrollándose en los frascos de cultivo, sin que la incubación  
les afecte, y en los cultivos testigo sin incubación con el INA,  
la incubación con el suero no afecta las células cancerosas. Esto  
435 prueba que la C1 IAC se comporta como un factor inhibitor y toma  
parte en el bloqueo de la acción anticancerosa del sistema inmu-  
ne, y que, igualmente, el INA es capaz de neutralizar in vitro  
este efecto de bloqueo. Cuando se neutraliza in vitro la C1 IAC  
por el INA, su efecto de inhibición sobre la activación de C4  
440 por C1 es neutralizado lo que significa que se interrumpe el blo-  
queo de la acción del sistema inmune, C4 se fija a las membranas  
de las células cancerosas y la acción posterior del sistema com-  
plementario se produce provocando la lisis de las células cance-  
rosas; después de la activación de C4, la reacción complementaria  
no puede ser frenada por ninguna influencia procedente de C1 IA  
445 o C1 IAC, como lo muestra la Figura 1.

El experimento in vitro descrito demuestra que el suero hu-  
mano no contiene anticuerpos contra las células cancerosas y que  
el sistema inmune humano no es capaz de detectar rápidamente que  
existen células cancerosas, lo cual se estima que se debe al  
450 efecto de ocultar la inmunidad del C1 IAC y otras proteínas de  
baja antigenicidad que cubren y ocultan las células cancerosas.  
Debido a esta ocultación las células cancerosas pueden existir  
en simbiosis en el cuerpo humano y pueden ser transportadas por  
los fluidos corporales sin ser detectadas ni atacadas por el sis-  
455 tema inmune humano.

Incluso cuando los anticuerpos de humores específicos a los  
componentes de las células cancerosas, se encuentran en contacto  
próximo con las células cancerosas, la activación del sistema  
complementario que normalmente se produce por una reacción anti-  
460 geno-anticuerpo puede quedar bloqueado a causa de la acción inhi-  
bidora de C1 IAC del sistema complementario.

Cuando INA ha reaccionado con C1 IAC en las membranas de las

células cancerosas, por lo menos se producen dos cambios importantes: se elimina el efecto de máscara del C1 IAC, así el sistema  
465 inmune es capaz de reconocer las células cancerosas como "no propias", y se elimina el bloqueo de la activación C4 producido por el C1 IAC, de modo que la reacción antígeno-anticuerpo entre los componentes de las células cancerosas y los específicos anticuerpos humanos que ahora es posible por el desenmascaramiento permitirá incrementar la no inhibida activación C1 de C4 y las siguientes reacciones del sistema de complemento.  
470

Por otra parte se sabe que las células cancerosas tienen una considerable carga negativa en el exterior y pueden repeler las células limfoideas. Como además por lo que se refiere a anticuerpos de fluidos el recubrimiento de anticuerpo en los linfocitos  
475 *B*, es otro importante factor en el sistema inmune, la repulsión de las células cancerosas de las células linfáticas debido a su carga negativa es otro mecanismo de defensa ejercido por las células cancerosas contra el ataque del sistema inmune. Se ha demostrado in vitro que cuando las células cancerosas han sido incubadas con INA su habilidad para repeler linfocitos se ha eliminado, lo que indica que los determinantes C1 IAC juegan un importante papel en el establecimiento de la carga negativa de las células cancerosas y que esta carga negativa se neutraliza cuando  
480 los determinantes C1 IAC están ocupados con los anticuerpos específicos.  
485

Por supuesto que el efecto opsonin, el efecto de adherencia inmune, el efecto de quimiotaxis y otros efectos que acompañan la activación del sistema complementario y del sistema inmune en conjunto también facilitan la acción citotóxica del sistema de defensa cuando los determinantes C1 IAC están ocupados con los anticuerpos específicos.  
490

De acuerdo con la invención, se puede pues luchar contra las células cancerosas controlando y disminuyendo su número mediante la administración in vivo del INA a pacientes cancerosos. Varios  
495

resultados muestran que en los sistemas biológicos bastante más complejos, presentes in vivo, el INA es capaz de poseer actividades idénticas a aquellas que se ponen en evidencia invitro.

500 La Patente se refiere a métodos para el tratamiento de los cánceres por inmunización pasiva contra las proteínas efectuando el enmascaramiento de las células cancerosas y el bloqueo del sistema de defensa inmune, este principio es completamente nuevo, no solamente en terapéutica anticancerosa, sino, en medicina en general.

505 Entre los efectos que se han observado después de la administración del INA a pacientes cancerosos, podemos mencionar:

1) Una disminución de la concentración sérica del "inactivador del C1" (suma de C1 IAC + C1 IA, medida con un antisuero que no establece distinción entre la C1 IAC y la C1 IA, como es el anti-C1 IA humano de conejo), y una disminución de la concentración sérica de la C1 IAC medida con un antisuero anti-C1 IAC monoespecífico. Se sobreentiende que, en el caso en que se utiliza un INA monoespecífico frente a la C1 IAC, se debe considerar que la disminución resulta de forma específica de la neutralización de la C1 IAC, pero como indicamos anteriormente, preferimos utilizar el INA conteniendo al mismo tiempo el anti-C1 IAC y el anti-C1 IA. Esta disminución del inactivador de C1 se produce generalmente después de un rápido aumento inicial.

515 2) Una disminución de la concentración sérica de C4.

520 Además, se han verificado varias manifestaciones de remisión, como sea una disminución de la masa tumoral y en ciertos casos una total desaparición de las células cancerosas. Sin embargo, los dos contenidos antes referidos del inactivador del C1, y en especial de la C1 IAC, y del C4 constituyen indicaciones importantes y fáciles de determinar de la evolución de la afección, antes, durante y después de la administración del INA, y, además, de todos tipos de terapéutica anticancerosa, como ya hemos indicado anteriormente.

525

530 La preparación de anticuerpos específicos dirigidos contra la C1 IAC, según la invención, permite igualmente establecer un diagnóstico de cáncer sin ambigüedad. El diagnóstico formulado de este modo se basa en la determinación de la presencia o de la ausencia de C1 IAC en los humores humanos y, en especial por motivos prácticos, en el suero humano. De acuerdo con la invención, 535 se determina la presencia o ausencia de C1 IAC en una muestra, sometiendo la muestra a una reacción inmunológica con el anti-C1 IAC humano en condiciones tales que el resultado de la reacción inmunológica sea fácil de distinguir de la respuesta debida a la presencia de la C1 IA en la muestra.

540 Esto significa que el antisuero INA y otras materias conteniendo anticuerpos u otras sustancias o derivados correspondientes a la actividad inmunológica, constituyen compuestos para diagnóstico extremadamente útiles. La aplicación de la invención al diagnóstico viene descrita detalladamente más adelante.

545 Para preparar los antisueros de acuerdo con la invención, es importante utilizar animales huéspedes cuyo sistema inmune sea capaz de establecer la diferencia entre la C1 IAC y la C1 IA, o sea capaz de formar anticuerpos específicos dirigidos contra la C1 IAC, habiendo ya citado ejemplos de dichos animales. Conviene 550 mencionar que no todas las razas ni todos los tipos de cerdos y de carneros parecen ser capaces de producir los antisueros útiles de la invención. Por ejemplo, una oveja de raza Shopshire, parece ser que no distingue entre C1 IAC y C1 IA, y un cerdo de la raza Yorkshire pura no permite obtener una cantidad adecuada de anticuerpos. Los conejos y los pequeños reedores no son capaces de 555 establecer la diferencia entre la C1 IAC y la C1 IA. Por otro lado, parece posible que razas o tipos de caballos y de vacas sean capaces de establecer la diferencia entre la C1 IAC y la C1 IA y de producir cantidades adecuadas de anticuerpos. Normalmente se sabe que los caballos y las vacas son animales que permiten obtener una buena producción de antisuero que se puede ex- 560

traer varias veces, por drainage mientras que los cerdos no pueden ser punzonados y generalmente son sangrados. De acuerdo con los principios de la invención, el animal huésped utilizado para preparar un antisuero INA de la invención es un animal de características filogenéticas similares a los indicados y que proporcionan una respuesta específica frente a la C1 IAC. Además, el animal huésped debe, de preferencia, poseer anticuerpos que sean generalmente bien tolerados por el hombre. Sobre este aspecto, se prefiere utilizar como animales huéspedes los cerdos.

Detalles adicionales referentes a la preparación de los antisueros y anticuerpos de la invención vienen reseñados bajo el título "Vacunación de los Animales Huéspedes" presentado más adelante.

Las vacunas utilizadas deben tener una composición tal que produzcan una elevada proporción de anticuerpos en el animal huésped utilizado, incluyendo una proporción elevada de anti-C1 IAC humano. Las vacunas que preferimos para preparar los antisueros en el cerdo y el carnero vienen mencionadas a continuación, bajo el título "Vacunación de los Animales Huéspedes", y la preparación de los componentes activos de las vacunas figura bajo los títulos "Preparación de la C1 IAC", "Purificación de C1 IAC/C1 IA a partir del líquido pleural/ascitis de pacientes cancerosos", y "Purificación de C1 IAC/C1 IA conteniendo cromonóide,  $\alpha_2$ HS glicoproteína y Zn  $\alpha_3$  glicoproteína del líquido pleural y de la ascitis" que presentamos más adelante.

Los antisueros producidos como se ha descrito con anterioridad están caracterizados por el hecho de que contienen anti-C1 IAC humano, o sea anticuerpos capaces de reaccionar de forma específica con las determinantes de la C1 IAC. Se puede poner en evidencia esta reacción específica según varias técnicas inmunológicas conocidas. En principio, podríamos someter los anticuerpos específicos anti-C1 IAC humanos, como la IgG anti-C1 IAC humana, a tratamientos bien conocidos de separación de los anticuerpos con-

595 servando la especificidad de los anticuerpos, por ejemplo para  
producir los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> correspondientes. Según el trata-  
miento de separación utilizado, los anticuerpos pueden o no con-  
servar su aptitud para provocar una reacción del sistema comple-  
mentario. En principio, estas modificaciones, derivados o fragmen-  
600 tos de los anticuerpos de acuerdo con la invención, habiendo con-  
servado su aptitud específica para bloquear las determinantes  
C1 IAC son útiles para el tratamiento y el diagnóstico del cáncer  
a causa de su capacidad de marcar las células cancerosas, de iden-  
tificar la C1 IAC y de neutralizar la actividad bloqueante de  
605 C1 IAC.

Por consiguiente, los anticuerpos, fragmentos de anticuer-  
pos, derivados de anticuerpos o modificaciones de los anticuer-  
pos de la invención pueden considerarse como anticuerpos, frag-  
mentos, modificaciones o derivados de anticuerpos capaces de  
610 reaccionar con células cancerosas cultivadas, de tal modo que  
las células cancerosas incubadas con anti-C1 IAC marcado o frag-  
mentos, modificaciones o derivados marcados correspondientes  
presentan un marcaje positivo, mientras que las células del mis-  
mo cultivo, preincubadas con neuraminidasa no presentan ningún  
615 efecto de marcaje después de la incubación con materia marcada,  
y que la presaturación con antisuero no marcado dirigido contra  
la C1 IAC seguida de una incubación con la inmunoglobulina mar-  
cada, una fracción de inmunoglobulina marcada, un derivado de  
inmunoglobulina marcada o una modificación de inmunoglobulina  
620 marcada según la técnica descrita en Acta path. microbiol, scand.  
Apartado B, 81, 365-372, 1973, no provoca ningún marcaje de las  
células cancerosas.

Podemos mencionar como ejemplos de modificaciones de anti-  
cuerpos, según la invención, los anticuerpos IgG de marcaje iso-  
625 tópico (preferentemente marcados con un isótopo teniendo un cor-  
to período en el caso de una utilización in vivo para el diagnós-  
tico, a título de ejemplos marcados con technétium) los cuales

debido a su capacidad de marcar las células cancerosas, son útiles en el campo del diagnóstico para confirmar la localización de tumores o de metastasis o anticuerpos específicos de la C1 IAC combinados químicamente con moléculas con actividad citostática, como por ejemplo derivados formados a partir de citostáticos conocidos, cuya carga citostática anticuerpos específicos C1 IAC abren la posibilidad de emplear citostáticos de un modo mucho más eficiente y seguro, siendo trasladados selectivamente los citostáticos a células cancerosas. (Se recuerda que las células normales aparentemente no producen ni C1 IAC ni C1 IA).

A pesar de las mencionadas posibilidades de modificar los anticuerpos, según se describe en esta Patente, en tanto los resultados obtenidos son excelentes en la terapia con antisueros y anticuerpos no modificados, no se considera aconsejable introducir modificaciones mientras no exista el convencimiento y la evidencia de que estas modificaciones son muy útiles.

La terapia del cáncer, según esta Patente, es una inmunización con anticuerpos producida en un animal huésped.

En la medida en que sea posible componer una vacuna que por administración parenteral a seres humanos da lugar a un incremento en la formación de anticuerpos contra C1 IAC, se considera que constituye un experimento peligroso, dado el riesgo evidente de que esta vacuna llevará a un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo en la normal y esperada función de C1 IA.

El hecho de que el antihumano de conejo C1 IA también bloquee los determinantes de C1 IAC puede asimismo indicar la utilidad del antihumano de conejo C1 IA en lugar de antihumano C1 IAC en la terapia de cáncer, pero dado que primeramente el antihumano de conejo C1 IA no es inmunológicamente bien compatible con el sistema humano, y segundo, debido a la no especificidad, el antisuero de conejo no puede ser producido en proporciones adecuadas entre un C1 IAC y un componente anti-C1 IA, por cuya razón probablemente serían precisas grandes cantidades de dicho suero para

bajar efectivamente el nivel del C1 inactivador, posiblemente con un descenso excesivo del nivel de C1 IA que a su vez exigiría su sustitución con C1 IA para evitar condiciones peligrosas debidas a deficiencia o carencia de C1 IA.

665 Una composición preferida de acuerdo con la invención, útil para el tratamiento de los cánceres humanos consiste en una solución 50 mg/ml de inmunoglobulina de IgG de cerdo, disueltos en solución salina isotónica (o de una solución equivalente, como por ejemplo una solución isotónica de glucosa). En la práctica  
670 se pueden acondicionar estas composiciones en frascos de 10 ml adecuados para la perfusión intravenosa después de la dilución en cantidades habituales de solución salina isotónica o de una solución equivalente.

Otra composición preferida está compuesta por inmunoglobulina liofilizada destinada a ser reconstituida. Las posologías adecuadas oscilan entre cerca de 20 y 30 mg de inmunoglobulina por  
675 kg de peso corporal del paciente y por día, del 1er al 5º día aproximadamente, y posteriormente de cerca de 10 mg/kg de peso corporal al día, durante cerca de 2 a 3 semanas. En el caso en  
680 que el paciente empieza a producir anticuerpos dirigidos contra la inmunoglobulina del animal huésped que está recibiendo, se le debe administrar cortisona.

Durante el tratamiento por el antisuero o los anticuerpos INA, se debe controlar cuidadosamente al paciente, como se describe bajo el título "Terapia del cáncer con suero inmune de  
685 acuerdo con la invención", y en especial los parámetros importantes a vigilar son los contenidos séricos de C1 IAC y de C4. Un tratamiento coronado de éxito debe eliminar la C1 IAC y llevar a la normalidad el contenido en C4. De acuerdo con la invención,  
690 se prefiere no efectuar un tratamiento simultáneo con agentes citostáticos debido al efecto inmunosupresor de estos agentes.

Los citostáticos unidos a C1 IAC como conductores selecti-

695 vos, pueden ser eficaces si se administran en cantidades inferiores, a las de los citostáticos convencionales.

700 Durante el tratamiento con el INA, se debe vigilar la formación en el paciente de anticuerpos dirigidos contra el INA, según las técnicas conocidas, utilizando como testigo INA marcada y, en el caso en que se verifique la formación de anticuerpos, se puede proseguir el tratamiento con el INA según un nuevo principio de la invención, o sea mediante inmunoadherencia al INA inmovilizado. De acuerdo con este principio, se puede aplicar anti-  
705 suero o anticuerpos INA a una matriz que los inmovilice haciendo pasar seguidamente el suero del paciente a través de una columna conteniendo este INA inmovilizado por una matriz. El principio de la eliminación de las proteínas del suero de un paciente, por inmunoadherencia a anticuerpos inmovilizados por una matriz es nuevo y constituye uno de los aspectos de la invención. Detalles adicionales respecto al tratamiento por INA inmovilizado vienen  
710 presentados bajo el Título "Desbloqueo y desensamblamiento extracorporales del suero de pacientes cancerosos", que se describe más adelante. Aunque este tratamiento extracorporal no neutralice la C1 IAC presente sobre las membranas de las células cancerosas, disminuye el contenido general del inactivador del C1 (y de preferencia de la cromomucoides, de la  $\alpha_2$ HS glicoproteína y de la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína) en el suero y mejora las posibilidades de destrucción de células cancerosas por los sistemas inmunes. A este efecto, así como en lo que se refiere a las anteriores explicaciones referentes al tratamiento por el  
715 INA, conviene tener presente que las condiciones de concentración y el equilibrio químico probablemente juegan un papel importante en las reacciones que se han descrito.

720 Se ha probado el hecho de que el anti-C1 IAC del anticuerpo INA es capaz de combinarse con las células cancerosas in vivo.

725           En la expectoración de un paciente portador de metastasis  
pulmonares de un carcinoma mamario, tratado por el INA de cerdo,  
hemos puesto en evidencia, según técnicas histológicas, la pre-  
730           sencia de células cancerosas. Se ha verificado la presencia de  
globulinas de cerdo utilizando globulinas anti-cerdo marcadas  
con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las células estudiadas  
de este modo presentaban una reacción positiva de inmunofluores-  
cencia. Esto prueba que el INA administrado al paciente es capaz  
de recubrir las proteínas de las células cancerosas del paciente.  
Además, no podemos detectar o apreciar ninguna inmunofluorescen-  
735           cia específica típica utilizando el anti-C1 IA humano de conejo  
marcado con isotiocianato de fluoresceína. El hecho es de especial  
importancia puesto que las células cancerosas provenientes de la  
pleura de este paciente, antes del tratamiento, presentaban un  
marcaje positivo por el C1 IA antihumano de conejo marcado con  
740           isotiocianato de fluoresceína. Tiene especial importancia porque  
las células cancerosas obtenidas de la pleura de este paciente  
antes del tratamiento, mostraban marcas positivas con C1 IA - FITC  
antihumano de conejo. Estas observaciones indican igualmente que  
el INA marcado por un isótopo, cuando es inyectado en un paciente,  
745           es capaz de marcar las células cancerosas.

          Para preparar un antisuero o una inmunoglobulina útil para  
el diagnóstico in vivo, después del marcaje isotópico, como por  
ejemplo, de preferencia, después del marcaje con el technetium,  
que tiene un período muy corto de 4 horas, se utiliza preferente-  
750           mente una vacuna que no contenga C1 IA.

          Los modos preferentes de realización de un sistema de diag-  
nóstico de acuerdo con la invención vienen descritos más adelante  
bajo el título "Sistemas de diagnóstico".

          Los sistemas de diagnóstico de la invención contienen una  
materia de tipo C1 IAC antihumano cuya reacción con la C1 IAC hu-  
mana en las pruebas inmunológicas es fácil de distinguir de la  
reacción con la C1 IA humana. Una de estas materias consiste en  
anti-C1 IAC humano monoespecífico (por ejemplo anti-C1 IAC huma-

no absorbido), que proporciona una reacción inmunológica con la  
760 C1 IAC, pero no lo hace con la C1 IA. Podemos mencionar como otra  
materia el antisuero de carnero conteniendo anti-C1 IAC humano  
y anti-C1 IA humano que en varias pruebas inmunológicas, da dos  
precipitaciones con un suero de un paciente canceroso y da una  
765 sola precipitación con un suero de un paciente no canceroso. Los  
antisueros que hemos descrito pueden ser utilizados en varias  
pruebas inmunológicas como una prueba de hemaglutinación, o una  
determinación radio-inmunológica (RIA), una prueba de inmunodifusión  
según Ouchterlony y Mancini, una prueba de inmunoelectroforesis,  
770 una prueba de inmunosautoradiografía sobre gel, etc. Los  
componentes específicos de estas composiciones, materias o sistemas  
de diagnóstico son evidentes para el especialista, puesto  
que hemos demostrado que existían materias que establecen la distinción  
entre la C1 IA y la C1 IAC.

775 La seguridad del método de diagnóstico y del producto, según esta Patente, es excelente.

Así, de muestras de suero de 1.600 personas que han sido  
examinadas empleando el método Ouchterlony, representado en la  
Fig. 3, en unos 800 casos se comprobó que el suero contenía  
780 C1 IAC. En alguno de estos casos las muestras eran de pacientes  
de cáncer comprobados, para constatar el método de diagnóstico.  
En otros casos las muestras que daban reacción positiva C1 IAC  
procedían de pacientes que no habían sido declarados como pacientes  
de cáncer, pero después del diagnóstico con INA, se comprobó  
que padecían cáncer.

785 En alguno de estos últimos casos, pacientes que demostraban  
reacción positiva C1 IAC no pudieron ser diagnosticados clínicamente  
como enfermos de cáncer, pero su cáncer se comprobó posteriormente,  
y en alguno de los casos positivos los pacientes habían sufrido una  
790 intervención quirúrgica y clínicamente no mostraban signo de reproducción,  
pero después de 2 a 6 semanas las pruebas mostraban nuevas metastasis.  
Ni en un solo caso el método

ha fallado un cáncer comprobado, y en ningún caso la prueba ha dado reacción positiva en pacientes que no padecieran cáncer.

- PREPARACION DE LA C1 IAC

- 795 - Obtención de células cancerosas humanas para cultivo.  
Se pueden obtener células cancerosas humanas a partir de líquido pleural o de líquido de ascitis de pacientes afectados de cáncer con metastasis pleurales y/o presentando una ascitis. Se debe manipular el líquido pleural y el líquido de ascitis en condiciones estériles y rechazar los líquidos pleurales y los líquidos de ascitis infectados.
- 800 Se pueden separar las células de los líquidos por centrifugación a 1000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado contiene las células. Se separa el supernatante que se conserva a menos 20° C. para aislar posteriormente las proteínas útiles, bajo el punto de vista inmunológico, como describiremos posteriormente.
- 805 Otra fuente de células está constituida por los tumores humanos sólidos extraídos en el momento de operaciones de los pacientes, como por ejemplo tumores cerebrales malignos de pacientes afectados de tumores cerebrales malignos primarios, se pueden obtener las células cancerosas de estos tumores por tripsinación. Por ejemplo, se lavan las muestras de tumores cerebrales varias veces en medio esencial mínimo de Eagle, se recorta el tejido en cubos de 1 a 2 mm, se colocan los cubos en suspensión en el medio, se lava y se centrifuga nuevamente por ejemplo durante 10 minutos a 900 r.p.m., se añade una solución de tripsina, se incuba por ejemplo durante 30 minutos a 25° C., después se filtra la suspensión celular por una gasa estéril, se mezcla con medio esencial mínimo de Eagle, añadido con 15% de suero de buey y se centrifuga como se indicó anteriormente.
- 815 El precipitado contiene las células y se decanta el supernatante.
- 820 Se pueden utilizar por separado los precipitados obtenidos como se indicó arriba o agrupar varios precipitados. Además se
- 825

puede tratar de un modo análogo células cancerosas humanas provenientes de otros orígenes y utilizarlas tal cual están o en combinación con células cancerosas obtenidas como se ha descrito anteriormente.

830 - Cultivo de células cancerosas.

Se introducen las células cancerosas obtenidas según hemos descrito anteriormente, en frascos de Roux de 1000 ml. conteniendo medio esencial mínimo de Eagle (MEM) enriquecido mediante la adición de cerca de 294 mg/l de glutamina y conteniendo 15% de suero de buey fetal inactivado y se incuba seguidamente en una estufa, después de la adición de dióxido de carbono. En los cultivos prueba paralelos, se cultivan directamente 0,5 ml. de suspensión celular sobre las paredes de un tubo de Leighton, para poner en evidencia la presencia de C1 IAC sobre las membranas celulares por citofotometría en inmunofluorescencia (Ogther y col., Acta.path. microbiol. scand. B 81, 365, 1973). Cuando se observa la presencia de C1 IAC en los cultivos prueba, se utiliza el cultivo principal como cultivo de producción. Se elimina el medio, se lava el cultivo celular con tampón PBS fosfatado, con un pH 7,3, se introduce medio sintético RPMI conteniendo aminoácidos de Flow, Escocia, enriquecido únicamente con cerca de 294 mg/l de glutamina, se incuba durante 3 días a 37° C. recólese el medio en condiciones estériles y se centrifuga este a 1000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se conserva el supernatante en frascos cerrados a -20° C esperando que se aísle la C1 IAC. Se cultivan después las células cancerosas en el medio esencial mínimo de Eagle modificado, ya mencionado, y después de 3 días de incubación, se sustituye de nuevo el medio por medio RPMI enriquecido con glutamina, que se

835

840

845

850

855 recoge pasados 3 días de incubación y que se trata y se gelifica como hemos descrito anteriormente. Se prosigue la alternancia de cultivo en el medio esencial mínimo de Eagle modificado y el medio RPMI enriquecido con glutamina, así como la recolección de este último en tanto en cuanto el cultivo de células cancerosas es productivo.

860 En el caso de un cultivo excepcionalmente bueno (bastante superior a cerca de  $2 \times 10^5$  células por frasco de Roux), se trasplantan otros cultivos en otros frascos de Roux y se utilizan estos nuevos cultivos celulares para la producción tal como se mencionó anteriormente. Durante la producción, se vigila la formación de C1 IAC por los cultivos celulares utilizando los cultivos prueba en tubos de Leighton, y antes del empleo se añade al medio de cultivo, penicilina y estreptomina en las concentraciones apropiadas.

870 - Aislamiento de la C1 IAC.

875 Se somete el medio RPMI enriquecido con glutamina, obtenido después del cultivo de las células cancerosas como se ha descrito anteriormente, a un "relargage" para precipitar las proteínas contaminantes, añadiendo hasta un 40% de la saturación de sulfato de amonio saturado a 0° C. y agitando. Se centrifuga el medio tratado de este modo, a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se pueden igualmente utilizar otras técnicas de centrifugación, pero esta que indicamos proporciona excelentes resultados. Se vuelve a echar el precipitado y se efectúa la diálisis del supernatante durante cerca de 48 horas a 4° C. en agua destilada que se cambia varias veces y después se centrifuga a 3500 r.p.m. a temperatura ambiente durante 15 minutos.

880 Se pueden emplear otras técnicas de centrifugación, utilizando por ejemplo un centrifugador refrigerado. Se obtiene una purificación excepcionalmente buena utilizando un ultra-centrifugador preparativo refrigerado.

885 El primer estadio del tratamiento posterior de la C1 IAC presente en el supernatante limpio es una cromatografía de absorción sobre columna. Para este fin se prefiere como resina cambiadora

890 de aniones, la resina Dowex 2 x 8, en partículas de 74 a 38 mi-  
cras, sin embargo se pueden igualmente utilizar otras materias  
cambiadores de iones. Se somete la resina cambiadora de iones a  
un pretratamiento por ebullición en agua durante 2 horas, a 5  
intercambios de 2 horas con ácido clorhídrico 0,1 M, después a  
895 un equilibrado por agitación con tampón Tris 0,06 M, a un pH de  
7,3, hasta que el pH esté estabilizado a cerca de 7,3. Se pueden  
igualmente utilizar otros tampones Tris y tampones fosfato tenien-  
do pH y fuerzas iónicas distintas, sin embargo el tampón antes in-  
dicado proporciona los mejores resultados.

900 Se introduce el supernatante límpido antes mencionado en la  
columna de resina intercambiadora de aniones Dowex 2 x 8 (columna  
K 50/100 provista de adaptadores), haciendo fluir el Tampón Tris,  
al pH 7,3 que indicamos, a razón de 100 ml/h a temperatura ambien-  
ta. Se obtiene el mejor rendimiento en C1 IAC utilizando 160 ml  
905 de medio RPMI para 1500 ml de carga de la columna. El efluente de  
la columna atraviesa la microcuba de flujo de un espectrofotóme-  
tro que proporciona un registro gráfico de la densidad óptica a  
580 nm del efluente (se utiliza un espectrofotómetro Inco) y se  
recoge en fracciones de 10 ml en un colector de fracciones. Con  
910 ocasión de esta operación y con ocasión de los fraccionamientos  
siguientes, se determina la C1 IAC de las proteínas elevadas  
puestas en evidencia por los picos de densidad óptica sobre el  
registro del espectrofotómetro operando mediante inmunoelectrofo-  
resis de tipo "rocket" con anti-C1 IA humano de conejo, anti-C1  
915 IAC humano de cerdo o anti-C1 IAC humano absorbido de carnero  
(que se prepara como se describe más adelante) en el gel y se do-  
sifican las proteínas contaminantes por inmunoelectroforesis cru-  
zada según Freeman utilizando un suero completo antiproteínas hu-  
manas en el gel y por inmunoelectroforesis según Grabar utilizan-  
920 do los dos tipos ya mencionados de antisuero. Se detectan las  
proteínas contaminantes por la presencia de orosc mucicoide, trans-  
ferina, la  $\alpha_2$ HS glicoproteína, inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina,  
prealbumina y albumina.

925 La mayor parte de la C1 IAC es absorbida en el intercambia-  
dor de iones. Por pasos repetidos a través del intercambiador de  
iones en el tampón Tris, se puede absorber el resto.

930 La mayor parte de las proteínas contaminantes aparece bajo  
la forma de un primer tipo principal de elución con ocasión de  
la elución por el tampón Tris. El registro espectrofotométrico  
típico de esta elución está ilustrado en la Figura 5. Después de  
que un número adecuado de fracciones haya seguido a la aparición  
del pico, se añade a la columna una solución de concentración  
935 creciente rectilínea de cloruro de sodio, hasta la obtención de  
una concentración final de 0,09 M en NaCl. El número de fraccio-  
nes anteriormente descrito como apropiadas es el número de frac-  
ciones que asegura una buena separación entre el primer pico y  
las proteínas eluidas posteriormente. Se puede igualmente utili-  
zar una solución salina cuya concentración aumente escalonadamen-  
te, sin obtener ventajas adicionales.

940 La C1 IAC se libera del intercambiador de iones en el punto  
final correspondiente a una concentración en cloruro de sodio de  
cerca de 0,09 M NaCl (como lo muestra un pequeño pico del regis-  
tro espectrofotométrico de la Figura 5), y se reagrupan las frac-  
ciones conteniendo la C1 IAC, después de efectuar su diálisis du-  
945 rante cerca de 24 horas a 4° C. contra agua destilada. Seguida-  
mente se liofiliza el producto dializado (la liofilización en co-  
quilla con la ayuda del vacío y un suave calentamiento exterior  
a 40° C., constituyen un procedimiento adecuado).

950 Se introduce el liofilizado en suspensión en tampón Tris  
0,06 M, a un pH de 8,6, y se introduce en una columna de filtra-  
ción sobre dextrano constituida por un gel de Séphadex (nombre  
comercial) G 75 superfino, tal como una columna Pharmacia K 15/50,  
utilizando como tampón efluente el tampón Tris a un pH de 8,6. El  
caudal adecuado es de cerca de 10 ml/hora. Se vigila el efluente  
955 utilizando el espectrofotómetro y se estudia el mismo según las  
técnicas de inmunoelectroforesis indicadas a continuación. Un re-  
gistro espectrofotométrico típico de la densidad óptica del eflu-

ente viene ilustrado en la Figura 6 y en la misma podemos observar un primer pico correspondiente a la C1 IAC. Se recogen las fracciones ricas en C1 IAC, se someten a una diálisis total contra agua destilada durante 48 horas, después se liofilizan como hemos descrito anteriormente. A continuación este producto se designará por "C1 IAC (Séphadex) G 75 Superf. " o "C1 IAC puro". El estudio por inmunoelectroforesis muestra que este producto es puro y no-agregado.

En otra técnica de purificación, se pone en suspensión el liofilizado de las fracciones dialisadas conteniendo la C1 IAC que se han obtenido con la resina intercambiadora de iones Dowex 2 x 8, en un tampón Tris 0,06 M, a un pH, 8,6, y se introduce sobre una columna (por ejemplo una columna K 25/50) provista de un intercambiador de aniones compuesto por celulosa Whatman DE-52 y equipada con adaptadores. Se hace la elución del intercambiador de aniones con un gradiente creciente rectilíneo de cloruro de sodio cuya concentración varía de 0 a 0,15 M NaCl. Se efectúan pasos repetidos sobre el intercambiador de iones Whatman hasta que se obtenga la purificación óptima determinada de acuerdo con las técnicas anteriormente mencionadas. La C1 IAC purificada de este modo es agregada en una cierta medida, como lo muestra el exámen por inmunoelectroforesis (véase la Figura 7).

Para utilizarles como agente inmunogénico en una vacuna adecuada para la primera vacunación de animales huéspedes apropiados, se reagrupan las fracciones ricas en C1 IAC del intercambiador de iones Whatman con las fracciones obtenidas con la columna de Séphadex G 75 superfina, y se hace la diálisis de las fracciones agrupadas, y después de liofilizan como hemos descrito anteriormente. A continuación pasaremos a llamar a este producto combinado "proteína C1 IAC aglomerada + C1 IAC Séphadex G 75 superfino". Este producto está listo para ser puesto en suspensión para ser eventualmente mezclado con otras proteínas, como se describe más adelante y/o para ser mezclado con C1 IAC para formar un antigüero

específico con propiedades óptimas.

- CARACTERIZACION DE LA C1 IAC.

- Materias y técnicas utilizadas en la caracterización y en otras operaciones que se describen a continuación.

995

Antisueros -

El anti-C1 IA humano de conejo (contenido en anticuerpos: 0,7 mg/ml),

el anti-C4 humano de conejo (contenido en anticuerpos: 1,0 mg/ml),

1000

el anti-C3 humano de conejo (contenido en anticuerpos: 1,2 mg/ml),

el antiactivador de C3 humano de conejo (contenido en anticuerpos: 0,5 mg/ml),

1005

el anti- $\alpha_2$ HS glicoproteína humana de conejo (contenido en anticuerpos: 0,35 mg/ml),

el anti-inhibidor de la inter- $\alpha$ -tripsina humana de conejo (contenido en anticuerpos: 1,0 mg/ml),

el antiorosomucoide humano de conejo (contenido en anticuerpos: 0,9 mg/ml),

1010

el antitransferina humana de conejo (contenido en anticuerpos: 2,5 mg/ml),

la antialbumina humana de conejo (contenido en anticuerpos: 1,1 mg/ml),

1015

el antiprealbumina humana de conejo-(contenido en anticuerpos: 0,25 mg/ml),

el anti- $\alpha_1$  fetoproteína humana de conejo (contenido en anticuerpos: 0,2 mg/ml),

el antiplasminogen humana de conejo (contenido en anticuerpos: 0,25 mg/ml).

1020

provenientes de Behringwerke).

El anti-IgG humano de conejo (contenido en anticuerpos: 0,4 mg/ml).

El anti-IgM humano de conejo (contenido en anticuerpos:

- 0,4 mg/ml) y
- 1025           el antisuero completo humano de conejo  
              (provenientes de Dakopatts).  
              Estreptoquinasa -  
              Se utiliza estreptasa conteniendo el equivalente a 100 000  
              unidades de estreptoquinasa (o sea 30 mg) en 10 mg de glutamina
- 1030           y 10 mg de hialuronidasa.  
              Se disuelve la estreptasa en 400 microlitros de solución sa-  
              lina 0,15 N, lo cual corresponde a 75 microgramos de estreptoqui-  
              nasa por ml. Se prepara la solución durante la hora que precede  
              la utilización.
- 1035           Plasma -  
              Se utiliza plasma fresco de sujetos sanos recogido en tubos  
              (14/15 mm) conteniendo 1 mm de ACD y 9 ml de sangre.  
              Suero -  
              Se extrae sangre humana por punción venosa sin anticoagulan-  
              te, a donantes sanos. Se deja coagular a temperatura ambiente du-  
              rante 1 hora y se conserva durante una noche a 4° C. Se prepara  
              el suero por centrifugación a 4200 r.p.m. durante 10 minutos a  
              4° C.
- 1040           Fibrinógeno bovino -  
              Se utiliza un preparado existente en el mercado conteniendo  
              60 mg de fibrinógeno bovino liofilizado, recién preparado a la  
              dilución de 0,4% para la fibrinólisis por difusión y al 0,6% para  
              la electroforesis sobre fibrina-agarosa.
- 1045           Neuraminidasa -  
              Procedente de *Vibrio cholerae* y conteniendo 500 unidades  
              por ml; (suministrada por Behringwerke).
- 1050           Immunolectroforesis -  
              Se utiliza un gel de indubiose A 37 Agarose (suministrado  
              por la Industria Bioquímica Francesa).
- 1055           Tampones -  
              Se utiliza el tampón Dienal, al pH 8,6, con una fuerza ióni-

ca de 0,02. El tampón salado con barbital está compuesto por barbital 0,025 M y cloruro de sodio 0,125 M a un pH 7,5 (Ratnoff, O.D., Davie, E.W., et Mallet, Studies on the Action of Hageman Factor : Evidence that Activated Hageman Factor in Turn Activates Plasma Thromboplastin Antecedent, J. Clin. Invest. 40:803, 1963).  
1060 Al tampón Véronal al pH 7,3-7,4 se añade  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  y  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .

C1 humano -

1065 Se prepara la C1-esterasa a partir de la fracción de euglobulinas por cromatografía sobre DEAE-celulosa utilizando tampón de Lepow conteniendo Na HEDTA como lo describe Bing. Se reagrupan las fracciones conteniendo las soluciones brutas de Clq, Clr y Cls y se efectúa su diálisis contra los tampones de fosfato de sodio, conteniendo 0,006 M, al pH 7,4, 0,015 M en EDTA, y se liofiliza.

1075 Clorhidrato del ester metílico de la N--acetil-L-arginina (AAME). Se disuelve AAME (de Cyclo Chemical Corp., Los Angeles, California), a la concentración de 0,015 M en tampón salino fosfatado y se ajusta al pH 7,4 mediante la adición de hidróxido de sodio 0,15 M.

EA -

1080 Se utiliza sangre de camero en un volumen igual de solución de Alsevers, conservado a 4° C., y un anboceptor (hemolisina), conservado a -20° C. (suministrado por el Serum Institute, Copenhagen), y se estandarizan por espectrofotometría como describe Mayer (Mayer, MM, Complement and Complement Fixation in Experimental Immunochemistry, E. A. Kabat & MM Mayer, Eds. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 2ª edición, P. 133, 1961).

1085 EAC1

Se prepara este complejo entre EA y Clq, Clr y Cls, a partir de EAC1.

Se mantiene la concentración en  $Ca^{++}$  a  $10^{-3}$  M. Se determina la actividad de este complejo midiendo la importancia de la hemo-

- 1090 lisis producida por una disolución apropiada de suero humano conteniendo  $16 \times 10^{-3} M$  de  $Na_2MgEDTA$  para quelatar  $Ca^{++}$  bloqueando la acción posterior de C1, pero permitiendo la reacción de C2, C4, etc.
- Experimentos
- 1095 - Immunoelectroforesis -
- Se efectúa una immunoelectroforesis cuantitativa en agarosa al 1% conteniendo un anticuerpo (espesor 1,5 mm) utilizando una corriente de 2,5 V/cm durante 18 a 20 horas a 20° C. (Laurell C.B., Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Ann. Biochem. 15:45 - 52, 1966). Se efectúa la immunoelectroforesis cualitativa según la técnica de Grabar & Scheidegger. Se efectúa la electroforesis cruzada antígeno-anticuerpo según Freeman (Clarke, H.C. & Freeman, T. A Quantitative Immunoelectrophoresis Method (Laurell Electrophoresis), p. 503 - 509 in Protides of the Biological Fluids. Vol. 14. Elsevier, Amsterdam, 1966; Laurell, C.B. Antigen-antibody Crossed Electrophoresis. Ann. Biochem. 10:358 - 361, 1965).
- 1100 Se efectúa una separación inicial por electroforesis sobre agarosa con una corriente de 10 v/cm durante 1½ horas a 20° C.
- 1105 Después de haber girado el campo eléctrico en 90°, se efectúa una electroforesis en un gel de agarosa conteniendo al anticuerpo, con una corriente de 2,5 V/cm durante 18 a 20 horas a 20° C.
- Immunodifusión -
- Se opera con agarosa al 1% según la técnica de difusión sobre gel de Ouchterlony (Ouchterlony, Ö. Progr. Allergy, 6:30, 1962). Se efectúa la difusión a temperatura normal durante 3 días.
- 1115 Immunoelectroforesis cruzada en tandem -
- Se opera según Krøll (Krøll, J. Tandem-crossed Immunoelectrophoresis, en A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis (Eds. Axelsen, NH, Krøll, J., Weeke, B.) Universitetsforlaget, Oslo, 1973, p. 57-59). El principio consiste en efectuar una electroforesis inicial de dos muestras de antígeno en la misma separación
- 1120

1125 con un gel de agarosa utilizando una corriente de 10 V/cm, durante 1½ horas. Después de haber girado el campo eléctrico de 90°, se efectúa una electroforesis en un gel conteniendo un anticuerpo, con una corriente de 2,5 V/cm durante 18 a 20 horas, a 20° C.

#### Electroforesis sobre gel de fibrina-agarosa

Se utiliza una modificación de la técnica de electroforesis sobre gel de fibrina descrita por Heimburger N. y col.

1130 Se prepara una solución de fibrinógeno bovino al 0,4% en una solución salina al 0,9%. Se añaden 9 partes de un fibrinógeno al 0,4% a 2 partes de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  de 0,1 N. Se incuba la solución de fibrinógeno a 37° C. para volverla totalmente viscosa sin que contenga fibrinógeno no diluido. Se añaden 2 partes de

1135 agarosa al 1% diluida en tampón diésal, y se mantiene la solución a 45° C. hasta que se emplee. Se echa el gel sobre microláminas, se coagula a temperatura normal, después debe calentarse en baño maría a 80° C. durante 60 minutos. Se colocan las muestras en los

1140 agujeros de la placa de electroforesis con fibrina-agarosa y se utiliza una corriente de 160 V durante 1½ horas, a temperatura ambiente. Después de la electroforesis, se colocan los reactivos indicados en las ramuras. Se efectúa la difusión a 37° C. durante una noche. Se mantiene seguidamente el gel de fibrina-agarosa en

1145 una solución salada al 0,9% en baño maría a temperatura normal, durante 24 horas después se lava durante 1 hora con agua destilada. Se colorean las láminas con azul brillante Coomassie.

#### - Propiedades biológicas de la C1 IAC

1) Inhibición del efecto de hidrólisis de la C1 esterasa.

1150 Se regenera la C1 esterasa a partir de fracciones brutas dializadas y liofilizadas de C1q, C1r y C1s, y se vuelve a poner en suspensión a una concentración correspondiente a cerca de 5 mg/ml. Se utiliza como fuente de  $\text{Ca}^{++}$  para la regeneración 0,1 ml de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  0,033 M por ml.

1155 Se determina la inhibición de las propiedades esterolíticas de la C1 esterasa incubando 0,5 ml de C1 esterasa con 0,25 ml

de C1 IA o de C1 IAC (teniendo una concentración en proteínas de 10 mg/ml) o como testigo del tampón fosfato de sodio, teniendo una fuerza iónica de 0,15, a un pH de 7,45. Se añaden 0,75 ml del tampón antes mencionado, a todos los tubos. Se incuban los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos.

1160

Se utiliza como sustrato 1 ml. de AAME (clorhidrato del ester metílico de la N-acetil-L-arginina) con la concentración de 0,015 M, que se añade a todos los tubos, antes de incubar durante 60 minutos a 37° C.

1165

Inmediatamente después de la adición del AAME y 60 minutos después, se sacan porciones de 1 ml. que se mezclan con 1 ml de formaldehído al 37%. Se mide la acidez valorable de la muestra inicial y de la muestra incubada durante 60 minutos, añadiendo hidróxido de sodio 0,05 N hasta un pH de 7,8.

1170

Se efectúan las determinaciones utilizando un medidor de pH 26 Radiometer (Radiometer, Copenhagen).

La hidrólisis de la AAME es parcialmente inhibida por cantidades tan bajas como 0,25 unidad/ml de C1 IAC, estos resultados son comparables al efecto de inhibición de la C1 IA que distintos autores indican en la literatura.

1175

2) Efecto de inhibición de la C1 IAC sobre la activación de C4 por C1, puesto en evidencia por la inhibición de la hemólisis en presencia de complemento.

1180

Se recurren eritrocitos de carnero, con amboceptor y con el primer componente purificado del complemento humano, según la técnica de Ruddy y col. Se utiliza el suero supernatante, desprovisto de C1, como fuente de los componentes de C2 a C9 del componente. Se utilizan eritrocitos de carnero a una concentración del 2% en tampón de veronal sódico sin gelatina. Se utiliza el amboceptor en la dilución de 1/400, determinada por titulación de la hemolisina. Se titula el complemento efectuando diluciones en serie en placas de microtitulación.

1185

Se mezclan 100 microlitros de EAC1 (la concentración de C1

1190 corresponde al volúmen de origen y se diluye en serie como se hace para el suero), 100 microlitros de suero desprovisto de C1 que se diluye en serie, y 50 microlitros de tampón veronal sódico (VBS) conteniendo 3 mg de C1 IAC ó 50 microlitros de tampón veronal sódico como testigo y se incuban a 37° C. durante 30 minutos. Se lee la hemólisis utilizando un espectrofotómetro PMQ II de 1195 Carl Zeiss, a la longitud de onda de 541 nm, en microcubas de cuarzo. Se determina C4, C3 y C1 IAC de las diluciones en serie por inmunoelectroforesis de tipo "huso". Como se puede ver por la Figura 8, las soluciones conteniendo la C1 IAC presentan una inhibición de la hemólisis en comparación con las soluciones que 1200 no contienen C1 IAC.

3) Ausencia de efectos de la C1 IA y de la C1 IAC sobre el tiempo de coagulación del plasma.

Se determina el efecto de la C1 IA y de la C1 IAC purificadas, sobre el tiempo de coagulación de la sangre según una modificación de la técnica descrita por Ratnoff y col. (Ratnoff, O. 1205 D., Copoly, J.E. & Pritchard, J.A. The blood Clotting Mechanism during Normal Parturition, J. Lab. Clin. Med. 44/408, 1954).

Se mezcla con 1 mm de plasma citratado teniendo una concentración de fosfato de calcio de 0,025 M en tubos de polistireno, C1 IA y C1 IAC, a la concentración de 10 mg por ml con un tampón 1210 testigo (tampón fosfato 0,005 M). Se añaden simultáneamente a los tubos 200 microlitros de C1 IA, C1 IAC o de tampón.

Se incuban las mezclas a 37° C en baño maría. El tiempo de coagulación es el período que transcurre entre la incubación y 1215 la coagulación.

La C1 IA y la C1 IAC, a la concentración de 1 mg/ml, no producen efecto sobre el tiempo de coagulación del plasma recalcificado, pobre en plaquetas, cuando se opera en tubos de polistireno (Cuadro I).

1220

CUADRO I

-Efecto de la C1 IA y C1 IAC sobre la coagulación de la sangre -

1225	Plasma regenerado por Ca <sup>++</sup>	Inactivador de C1 (número)	Tiempo de coagulación minutos + segundos
	Donante Nº 16697	C1 IAC líquido pleural (4010)	4 0
	" " "	Tampón	4 15
	" " "	C1 IAC líquido pleural (4011)	4 15
1230	" " "	Tampón	4 15
	" " "	C1 IAC líquido ascitis (4014)	4 0
	" " "	Tampón	3 45
	" " "	C1 IAC líquido ascitis (4015)	3 45
	" " "	Tampón	3 45
1235	" " "	C1 IA (donante) (4021)	3 45
	" " "	Tampón	3 45
	" " "	C1 IAC <sub>MEM</sub> (4023)	3 45
	" " "	Tampón	3 30
	" " "	C1 IAC <sub>HPMI</sub> (4025)	3 30
1240	" " "	Tampón	3 15
	" " "	C1 IAC <sub>MEM</sub> (4026)	4 0
	" " "	Tampón	3 45

1245 El sistema de regeneración está compuesto por 0,5 ml de plasma con Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,025 M.

El tampón es tampón fosfato 0,05 M, pH 7,4.

Se mantienen aproximadamente constantes las concentraciones de C1 IAC y de C1 IA, a partir de la concentración determinada por inmunoelectroforesis de tipo "rocket" y del peso seco de la proteína purificada.

1250

1255 Por lo tanto, el tiempo de coagulación para plasma adicionado de C1 IAC o de C1 IA así que para un plasma con un contenido de C1 IA de cerca de 30 mg/100 ml. varía de 60 segundos sin diferencia significativa entre los plasmas a los cuales se ha mezclado C1 IAC o C1 IA y los plasmas a los cuales no se han mezclado estos compuestos. La media del tiempo de coagulación en este sistema corresponde a la media del tiempo de coagulación encontrada por Ratnoff y col., en la referencia mencionada.

1260 4) Efecto de inhibición de C1 IAC sobre la fibrinolisis.  
Se estudia el efecto de inhibición de C1 IAC sobre un sistema regenerado compuesto por plasma recalcificado por fosfato de calcio.

1265 Se pesan los coágulos antes de provocar su lisis por 100 000 unidades/ml de estreptocinasa (Streptase, 20 microgramos). Se anota el peso de los coágulos individuales después de 6 horas de incubación (en tubos sellados) a 37 ° C. y se comparan a los pesos originales de los coágulos individuales antes de su lisis. Antes de efectuar la lisis, se añade al plasma coagulado C1 IAC o C1 IA en la concentración de 10 mg/ml o  
1270 tampón como testigo. Los resultados vienen presentados en el Cuadro II, en la página siguiente.

CUADRO II

- Estudio de la lisis de los coágulos -

1275	Plasma regenerado por Ca <sup>++</sup>	Nº del C1 IAC o del C1 IA/ tampón	Peso del coágulo antes de la lisis (g)	Lisis por Streptase (microgramos)	Peso del coágulo 6 horas después de lisis (g)
	Donante Nº 16697	4011	0,368	20	0,039
	" " "	Tampón	0,371	20	0,026
	" " "	4014	0,365	20	0,047
	" " "	Tampón	0,363	20	0,033
	" " "	4015	0,361	20	0,047
	" " "	Tampón	0,367	20	0,025
	" " "	4021 (C1 IA)	0,367	20	0,038
	" " "	Tampón	0,365	20	0,025
	" " "	4023	0,360	20	0,030
	" " "	Tampón	0,361	20	0,029
	" " "	4025	0,364	20	0,044
	" " "	Tampón	0,365	20	0,036
	" " "	4026	0,363	20	0,043
	" " "	Tampón	0,361	20	0,034

1295 El sistema regenerado está compuesto por plasma y Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.  
 Se utiliza para la lisis una cantidad de Streptase correspondiente a 100 000 unidades de estreptoquinasa por ml. Se mantiene prácticamente constante la concentración de C1 IAC o de C1 IA a partir de los resultados de la inmunoelectroforesis de tipo "rocket" y del peso seco de la proteína purificada.

1300

Como muestra el Cuadro II la lisis de los coágulos es inhibida hasta cierto punto por la C1 IAC.

5) Efecto de inhibición de la C1 IAC sobre el sistema fibrinolítico del plasma puesto en evidencia por electroforesis sobre fibrina-agarosa.

1305

Se utiliza el método de operar que se describe detalladamente a continuación. Las materias colocadas en los agujeros o en las ranuras figuran en el Cuadro III, abajo.

CUADRO III

1310 - Combinación estudiada por electroforesis sobre fibrina-agarosa-

Perforaciones	Ranuras
Suero Humano, no diluido	Estreptoquinasa 10000 unid/ml
Suero humano, no diluido	Estreptoquinasa 10000 unidades/ml + C1 IAC, en la concentración de 1 mg/ml
Plasma conteniendo 40 unidades de estreptoquinasa/ml	Anti-profibrinolisina
1320 Plasma conteniendo 40 unidades de estreptoquinasa/ml	C1 IAC en la concentración de 1 mg/ml
Suero humano, no diluido	Plasma conteniendo 40 unidades de estreptoquinasa/ml
1325 Suero humano, no diluido, conteniendo 1 mg/ml de C1 IAC	Plasma conteniendo 40 unidades de Estreptoquinasa/ml

1330 El estudio de las mezclas de C1 IAC y de plasma humano al que se añadió estreptoquinasa, muestra que la C1 IAC a la concentración final de 1 mg/ml inhibe la actividad de la fibrinolisina.

La fibrinolisis está puesta en evidencia por una zona clara formada en la red de fibrina. Se verifica que la zona clara formada con el suero mezclado al C1 IAC es más pequeña que la zona clara obtenida con el suero testigo al que se añadió tampón.

1335 El estudio por electroforesis en un gel de fibrina y de agarosa de un plasma al que se añadió estreptoquinasa con anti-profibrinolisisina en una ranura y C1 IAC en la otra ranura muestra una zona de inhibición del consumo de la fibrina en una región correspondiente al precipitado de profibrinolisisina y a la

1340 ranura conteniendo la C1 IAC.

Las pruebas de electroforesis sobre gel de fibrina-agarosa efectuados sobre suero humano mezclado con C1 IAC en la concentración de 1 mg/ml, inmediatamente después de la adición de estreptoquinasa en las ranuras, muestran la ausencia de consumo en

1345 el gel de fibrina-agarosa y muestran consumo para un suero no conteniendo C1 IAC.

6) Efecto del pH sobre la inhibición del efecto de hidrólisis de la C1 esterasa por la C1 IAC.

Se estudia el efecto del pH sobre la actividad biológica de la C1 IAC en la gama de pH de 3 a 11. Se diluye C1 IAC purificada a una concentración de cerca de 30 mg%. Se estudian porciones de 2,0 ml de la solución de C1 IAC llevándolas al pH deseado mediante ácido clorhídrico 0,15 N o hidróxido de sodio 0,15 M. Se mantienen las mezclas a 42 C. durante 18 horas y después

1355 se lleva el pH a  $7,4 \pm 0,1$ . Se eleva el volumen de cada mezcla a 3,0 ml añadiendo cloruro de sodio 0,15 M y finalmente a 4,0 ml con 1,0 ml de fosfato de sodio, al pH 4,7 teniendo una fuerza iónica de 0,15. Se sacan cantidades de 0,25 y 0,5 ml de cada mezcla para determinar en estas el efecto inhibitor de la C1 IAC.

1360 El principio de la determinación de esta inhibición es el bloqueo del efecto esterase de C1 sobre el AAME.

La actividad de la C1 IAC disminuye progresivamente por debajo de pH 5,5 y por encima de pH 10,5.

1365 7) Efecto del calor sobre la inhibición del efecto de hidrólisis de la C1 esterasa por la C1 IAC.

Se determina la estabilidad de la C1 IAC incubando C1 IAC purificada en cloruro de sodio 0,15 M mantenido a un pH de 7,1 durante 30 minutos a distintas temperaturas oscilando entre 0 y 60° C. Se determina la actividad biológica evaluando el efecto inhibidor de la C1 IAC sobre la hidrólisis del AAME por la C1 esterasa. Se opera sobre muestras de 0,5 ml. Constatamos que la actividad de la C1 IAC disminuye considerablemente después de la incubación a temperaturas que sobrepasan los 56° C.

- Propiedades inmunológicas de la C1 IAC

1375 8) Inmunolectroforesis según Grabar-Scheidegger

Cuando se efectúa una inmunolectroforesis según Grabar-Scheidegger con el anti-C1 IA humano de conejo, se obtiene para la C1 IA un precipitado en ala de gaviota mientras que la C1 IAC no proporciona precipitación en ala de gaviota (Figura 9). (El precipitado en ala de gaviota fué descrito por Hirschfeld (1960)).

1380 El precipitado de C1 IAC se extiende en la zona  $\beta$  cuando se efectúa la inmunolectroforesis en presencia de lactato de calcio (véase la Figura 9).

1385 9) Inmunolectroforesis de tipo "rocket" según Laurell (o de husada)

Por inmunolectroforesis de tipo "rocket" según Laurell con el anti-C1 IA humano de conejo, se observa una ligera diferencia en la configuración de las imágenes en forma de husadas (rockets), que son un poco más embotadas para la C1 IAC que para la C1 IA, aproximadamente como ilustra la Figura 7.

1390 10) Inmunolectroforesis cruzada en tandem según Krøll

Utilizando el anti-C1 IA humano de conejo, se constata por inmunolectroforesis cruzada en tandem una identidad total entre C1 IA y C1 IAC, como lo muestran las Figuras 11 y 12.

1395 11) Inmunolectroforesis cruzada según Freeman

Utilizando antiproteínas séricas totales humanas de conejo, se obtiene por inmunoelectroforesis cruzada según Freeman con C1 IA purificada y C1 IAC purificada, precipitados idénticos (teniendo un aspecto parecido al que ilustra la Figura 14, 2ª pico).

1400 12) Efecto de la neuraminidasa sobre las propiedades inmunológicas de la C1 IAC

Se incuba 1 ml de C1 IAC purificado con una concentración de cerca de 1,0 mg/ml con 0,2 ml de neuraminidasa de *Vibrio cholerae* (V.C.N.) correspondiente a 100 unidades de neuraminidasa (una unidad de neuraminidasa es la cantidad de enzima suficiente para liberar 1 ng de ácido N-acetil neuramínico a partir de una  $\alpha$ -Glicoproteína humana).

1405 Se agita la mezcla y se incuba a 37° C. durante 15 minutos. El testigo contiene 0,2 ml de tampón fosfato 0,09 M.

1410 Se somete la C1 IAC purificada, tratada de este modo, a una inmunoelectroforesis cruzada en tandem con anti-C1 IA humano de conejo; se obtiene una sola curva (Fig. 13) correspondiente a la C1 IAC; la C1 IAC tratada por la neuraminidasa no es capaz de formar precipitado. (La curva es muy elevada debido a la concentración excesiva del anti-C1 IA humano de conejo, en relación con la C1 IAC en este experimento concreto).

1415 Por inmunoelectroforesis según Grabar-Scheidegger con el anti-C1 IA humano de conejo, se verifica que la C1 IAC tratada por la neuraminidasa, como se ha descrito anteriormente no da precipitado (véase la Figura 10).

-1420 13) Inmunodifusión según Ouchterlony con un antisuero oligoespecífico

1425 En pruebas de inmunodifusión según Ouchterlony utilizando un antisuero producido con cardos "Dansk Landrace" o "Yorkshire race" mezclado con "Dansk Landrace" o sobre carneros de Tipo "Jyak Hederace", o de carneros de raza Oxford Down, que se han vacunado con vacuna conteniendo C1 IAC y C1 IA como son las vacunas de tipo 1 ó 2 que se describen bajo el título "Vacunación

de los animales huéspedes", o un antisuero proveniente de otro animal capaz de establecer la diferencia entre C1 IAC y C1 IA y que se haya vacunado con vacunas conteniendo C1 IAC y C1 IA en cantidad suficiente para que se obtenga una reacción de inmunización; la C1 IAC proporciona un precipitado diferente del de la C1 IA. Por ejemplo, el suero de un paciente canceroso da dos precipitados distintos, mientras que el suero de donantes sanos (o de pacientes con afecciones no malignas) solamente da un precipitado, que es el precipitado de C1 IA. Uno de los precipitados del suero de los pacientes cancerosos corresponde al precipitado de C1 IA del suero de los pacientes cancerosos. La Figura 3 ilustra una inmunodifusión de este tipo. En los dos agujeros centrales, se introduce antisuero oligospecífico y en los agujeros de la circunferencia se introduce suero de donantes sanos ("DONANTE") y de varios pacientes. Se introduce el suero correspondiente a cada muestra en dos agujeros opuestos. En el caso ilustrado, el antisuero ilustrado provenía de un carnero vacunado con una vacuna de tipo 1 (véase más adelante "Vacunación de los animales huéspedes").

La Figura 3 muestra la formación de un precipitado interior importante idéntico para el donante y para todos los pacientes. Es el precipitado de C1 IA. Sin embargo, el suero del paciente 3 (cáncer confirmado) da un precipitado complementario fácil de distinguir del precipitado de C1 IA. Es el precipitado de C1 IAC. Igualmente, todos los sueros dan un precipitado exterior más débil, que es el precipitado de cromosucido.

Es evidente que se puede fácilmente distinguir el precipitado formado por la C1 IAC del precipitado formado por la C1 IA. La inmunodifusión ilustrada por la Figura 3 corresponde a experiencias efectuadas a objeto de diagnóstico; se han puesto de manifiesto otros tipos de precipitación análogos con mezclas de C1 Ia pura y de C1 IAC, y hay que decir que la técnica de Ouchterlony es solamente un ejemplo de las técnicas inmunológicas de identificación o de determinación (se podrían igualmente mencio-

nar las técnicas de Laurell, Mancini y otros) que permite diferenciar C1 Ia y C1 IAC utilizando un antisuero oligoespecífico.

1465 - Otras propiedades de la C1 IAC

14) Determinación del peso molecular de la C1 IAC según la técnica de filtración sobre gel.

Se equilibra una columna de filtración sobre gel Sephadex G200 (Pharmacia K 25/50) con tampón Tris, a un pH de 8,6. Se introduce en la columna una solución de C1 IAC-Sephadex G75 Superfine, albumina humana purificada (que se ha cromatografiado y cuya pureza fué comprobada por inmunolectroforesis), hemoglobina (preparada por hemólisis de eritrocitos y purificada, cuya pureza se ha comprobado) e IgG purificada (con un peso molecular de 130 000 - 150 000) y se estudia el efluente por análisis espectrofotométrico, confirmando la identidad de los picos por inmunolectroforesis. El primer pico está compuesto de IgG, y antes de que haya desaparecido por completo, un segundo pico (C1 IAC) comienza a aparecer.

1480 Cuando haya pasado el pico de la C1 IAC, se notan numerosas fracciones prácticamente vacías y aparece el pico siguiente, debido a la albumina. Casi inmediatamente después del pico de la albumina, aparece el pico de hemoglobina.

A partir del registro espectrofotométrico, es evidente que el peso molecular de la C1 IAC debe ser superior al peso molecular de la albumina, el cual es de 60 000, y justamente inferior al peso molecular de la IgG. El peso molecular de IgG se determina solo aproximadamente entre 130 000 a 150 000, la misma imprecisión se aplica a la evaluación del peso molecular de la C1 IAC, el cual es de un valor entre 110 000 - 130 000, tomando como base la posición del pico correspondiente al C1 IAC.

15) Constante de sedimentación de la C1 IAC determinada a partir de la velocidad de sedimentación en ultracentrifugación.

Condiciones experimentales:

- 1495 - Ultracentrifugadora : ultracentrifugadora analítica Mk2 de MSE, dispositivo óptico: Schlieren.
- Células de Ultracentri- : células de 10 mm con doble sector de doble separación sintética y con re-  
bosadero.
- 1500 - Muestra : C1 IAC pura, proveniente de un cultivo de células de carcinoma de mama de origen humano en el medio RPMI.
- Velocidad de rotación : 1ª experiencia: 60 000 r.p.m.  
2ª experiencia: 60 010 r.p.m.
- 1505 - Temperatura : 1ª experiencia: 19,7º C.  
2ª experiencia: 20,2º C.
- Análisis de la solución : 1ª experiencia:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,02 M,  
NaCl, 0,1 M, al  
pH 7,00.
- 1510 : 2ª experiencia:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,02 M,  
NaCl, 0,1 M, al  
pH 7,00

- Resultados

. 1ª Experiencia (c = 0,55%) -

1515	Foto nº	Tiempo transcurrido después de mantener la velocidad	(s <sub>0</sub> ) apr. = $\frac{1}{\omega^2} \frac{\Delta n r}{\Delta \epsilon}$
	4	10 seg.	5,29 s
	5	210 seg.	4,94 s
	6	410 seg.	4,82 s
1520	7	610 seg.	4,98 s
	8	810 seg.	4,57 s

Los resultados de la 1ª experiencia vienen ilustrados por el gráfico 1, de la Figura 15.

1525 Por extrapolación (regresión lineal de valores) al menisco ( $r_{T_0}$ ), se obtiene el siguiente resultado (véase el Gráfico 1) :

$$s_c = s_{19,7}^c \text{ sol.} = 5,28 \text{ s.}$$

. 2ª Experiencia (c = 0,94%) -

Foto nº	Tiempo transcurrido después de mantener la velocidad	$(s_c)_{\text{apr.}} = \frac{1}{\omega} \frac{\Delta}{2} \frac{n r}{t}$	
1530	7	0 seg.	5,00 s
	8	201 seg.	4,71 s
	9	402 seg.	5,06 s
	10	603 seg.	5,06 s
	11	804 seg.	5,01 s
1535	12	1005 seg.	4,86 s

Los resultados de la 2ª Experiencia están ilustrados en el Gráfico 2, de la Figura 15.

Por extrapolación (regresión lineal de los valores al menisco  $(r_T)_0$ ), se obtiene el siguiente resultado (véase el Gráfico 2):

$$1540 \quad s_c = s_{20,2}^c \text{ sol.} = 4,97 \text{ s.}$$

- Conversiones a las condiciones estandar:

. 1ª Experiencia (c = 0,55%) -

$$s_{20,\text{sol.}}^c \approx s_{19,7,\text{sol.}}^c \times \frac{\eta_{19,7,\text{sol.}}}{\eta_{20,\text{sol.}}} \approx 5,28 \times 1,01 \text{ s}$$

$$s_{20,w}^c \approx s_{20,\text{sol.}}^c \times \frac{\eta_{20,\text{sol.}}}{\eta_{20,w}} \approx 5,28 \times 1,01 \times 1,03 = \underline{5,49 \text{ s}}$$

1545 . 2ª Experiencia (c = 0,94%) -

$$s_{20,\text{sol.}}^c \approx s_{20,2,\text{sol.}}^c \times \frac{\eta_{20,2,\text{sol.}}}{\eta_{20,\text{sol.}}} \approx 4,97 \times 0,995 \text{ s}$$

$$s_{20,w}^c \approx s_{20,\text{sol.}}^c \times \frac{\eta_{20,\text{sol.}}}{\eta_{20,w}} \approx 4,97 \times 0,005 \times 1,03 = \underline{5,09 \text{ s}}$$

Conviene tener presente que la conversión en condiciones estandar, no se tiene en cuenta la corrección de densidad, ni la corrección del volumen específico parcial de C1 IAC.

El factor de corrección correspondiente está probablemente muy cerca de 1.

Extrapolación a  $c = 0$ . Véase el Gráfico 3, Figura 15.

El Gráfico 3 muestra que:

1555 
$$S_{20,w}^c = 6,2 S.$$

Las Figuras 16 y 17 corresponden a las fotos N<sup>o</sup>s. 4, 6 y 8 de la 1<sup>a</sup> Experiencia, y 7, 9 y 11 de la 2<sup>a</sup> Experiencia.

Además, la Figura 18 muestra dos fotos a  $t < 0$ seg (tomada durante la aceleración a 30 000 r.p.m.) e igualmente a  $t = 1206$  y 1608 segundos, respectivamente.

-DEMOSTRACION DE LA ASOCIACION DE LA C1 IAC al CANCER

Las materias y los métodos utilizados en esta experiencia son aquellos que se describen a continuación.

1565 Exudados pleurales o ascitis provenientes de pacientes que sufren de carcinomas adelantados, sirven de fuentes para realizar el cultivo de células de carcinomas. Se excluyen los fluidos contaminados. Los cultivos celulares creados en frascos Roux y en frascos de plástico de Falcon, son repartidos entre un crecimiento en colonias y un desarrollo más difuso.

1570 La morfología de las colonias presenta una polimorfía de núcleos y de células, un nucleolo grande o varios nucleolos, muchas células con varios núcleos. Se aprecian numerosas mitosis. Entre estas mitosis, varias son atípicas. Las células están suficientemente adheridas al plástico y al cristal.

1575 27 de los 37 cultivos de carcinomas humanos son sub-cultivados de 1 a 4 veces. Esto hace un promedio de 1,8 sub-cultivos de 27 cultivos. Se cultivan entonces líneas de células y se utilizan estas para producir C1 IAC durante un período que oscila entre 2 y 5 meses. 10 cultivos de células de carcinomas no son sometidos a un sub-cultivo, y son luego utilizados para producir

1580 C1 IAC durante cerca de 2 meses.

La C1 IAC desprovista de células es recogida aproximadamente una vez a la semana, y liberada alternativamente en un medio MEM conteniendo 15% de suero de vaca fetal inactivado y en un medio amino ácido RPMI. Se pueden de este modo efectuar 4 recolecciones al mes a partir de un mismo cultivo de células.

En total, se efectúan 235 aislamientos de C1 IAC. Entre estos aislamientos, se efectúan 37 a partir de líquido pleural y de ascitis desprovistos de células.

Se efectúan 101 aislamientos a partir del medio MEM conteniendo 15% de suero de vaca fetal inactivado y 97 aislamientos a partir del medio RPMI. Sobre cada uno de los cultivos de células de carcinoma, se aísla la C1 IAC entre 2 y 14 veces. Esto hace un promedio de 5,4 operaciones de aislamiento por cultivo celular. Durante el período de crecimiento en el medio RPMI, el desarrollo celular se ve disminuído, mientras que durante el período de crecimiento en el medio MEM conteniendo el suero de vaca fetal inactivado, las células recuperan su ciclo de crecimiento normal in vitro. En varios cultivos celulares es necesario dejar que el cultivo celular se desarrolle más, antes de reutilizar el medio RPMI. Se mantiene una cantidad óptima de células en un cultivo de cerca de  $2 \times 10^5$  células por frasco Roux. Se controla continuamente los cultivos celulares para examinar el desarrollo de los distintos tipos de células. Los tipos de células provenientes de la pleura y de la ascitis consisten en células de carcinomas, en fibroblastos y células mesoteliales. En frascos con crecimiento colonial de células de carcinomas, no se hace difícil establecer una cantidad aproximada de estas células. Sin embargo en los cultivos celulares de crecimiento relativamente difuso, es más difícil determinar la cantidad aproximada de las células de carcinomas. La cantidad de células produciendo la C1 IAC está asociada a la cantidad de células revestidas de C1 IAC, tal como se encuentra por medio de la citofotometría, a partir de líneas de cultivos celulares idénticos.

Se utiliza un total de 37 pacientes en calidad de donantes.

La edad de los pacientes está comprendida entre los 33 y los 80 años. Hay 34 hembras y 3 varones. Los 37 pacientes son tratados en el hospital en el cual se les eliminan los líquidos pleurales y ascitis. Todos los enfermos presentan carcinomas muy avanzados de varios orígenes. Todos ellos ya han sido sometidos, durante su enfermedad a de 1 a 3 tratamientos por radiación. Todos los enfermos fueron tratados con citostáticos y cortisona o prednisona. 25 pacientes son tratados con cortisona o prednisona durante el período en que han servido de donantes.

1625 Cultivos testigo de células humanas -

Trasudados pleurales y ascitis provenientes de pacientes que sufren de enfermedad no neoplásica sirven de fuente de células no malignas. Esta forma de fuente de células para un cultivo in vitro ha probado ser una fuente suficiente. La fijación al frasco Falcon es suficiente, sin embargo se hace más difícil sobre los frascos de cristal del tipo Roux. La experiencia muestra que hace falta un período más largo de tiempo para obtener una cantidad suficiente de células para la producción de proteínas, comparables a aquellas que se obtienen en un cultivo de células malignas. No se obtiene ningún desarrollo colonial; todos los cultivos de células se desarrollan de modo difuso.

1630 Las células que hemos encontrado sobre los frascos son fibroblastos y células mesoteliales. En total, se hacen 28 aislamientos testigo de proteínas para detectar una proteína parecida a la C1 IA o a la C1 IAC.

1640 Al igual que para los cultivos de células de carcinomas, se recoge la proteína desprovista de células aproximadamente una vez a la semana, y se deja alternativamente en un medio MEM conteniendo 15% de suero de vaca fetal inactivado y en un medio ácido amino RPMI. Además se examinan cultivos celulares testigo, por inmunofluorescencia y citofotometría para buscar la presencia de depósito de inactivador C1, como indicaremos más adelante.

1645 Citofotometría por inmunofluorescencia -

1650 Las medidas citofotométricas son efectuadas sobre 36 cultivos celulares primarios provenientes de pacientes portadores de carcinomas y sobre 10 cultivos de células de control provenientes de líneas celulares no malignas.

1655 Se utiliza un total de 25 cultivos secundarios provenientes de líneas celulares de carcinomas para realizar las medidas citofotométricas, a fin de establecer la capa de C1 IAC sobre las líneas de células de carcinomas sub-cultivadas. La capa de C1 IAC está asociada a una membrana, tal y como lo muestran las fotos de células presentando una inmunofluorescencia positiva.

1660 Entre las líneas de células primarias de carcinomas, un promedio del 51,3% de células muestra una inmunofluorescencia específica con el anti-C1 IA-FITC, tal como se mide por citofotometría. Las distribuciones medias de medidas de inmunofluorescencia sobre cultivos de células de carcinomas vienen indicadas en la Figura 19. Se estima que los valores inferiores a 40 u.p. corresponden a señales no específicas.

1670 Un promedio del 58,4% de las células provenientes de las líneas de células sub-cultivadas muestra una inmunofluorescencia específica. Cuando se comparan las células de carcinomas cultivadas de forma primaria con las líneas de cultivo sub-cultivadas, la cantidad de células que presentan un depósito de C1 IAC varía de un modo significativo.

En algunas de las líneas de células sub-cultivadas, la cantidad de células cubiertas de C1 IAC es superior a aquella que encontramos en su cultivo de origen.

1675 Cuando se efectúa una inmunofluorescencia específica de control, como la que realizamos con presaturación del cultivo celular con anti-C1 IA no marcado, seguida de una incubación con anti-C1 IA-FITC y anti-C1 IA-FITC neutralizado (con C1 IA purificado), no verificamos valores que excedieran de la línea de separación, y por lo tanto no encontramos una única célula que mostrara una inmunofluorescencia específica. Los cultivos de células de control (células no malignas), examinadas por citofoto-

1680

metría, no presentan ningún capa de inactivador de C1. Los valores determinados respecto a estas células son todos inferiores a 40 u.p. Los valores de los cultivos de células de control son distribuidos en bruto como los valores obtenidos en el control de la especificidad de la inmunofluorescencia. La regularidad de los resultados obtenidos con los cultivos de células de control es de por lo menos un 63%, y es de por lo menos un 90% con los cultivos de células malignas. La diferencia significativa es inferior a 0,002 (prueba exacta de Fischer). Medios de control MEM conteniendo 15% de suero de vaca fetal inactivado y medios de control RPMI (que no son utilizados para el cultivo celular) son sometidos a una inmunoelectroforesis antes y después de una elución sobre Dowex. Los medios estudiados no revelan la presencia de líneas de precipitación frente al antisuero anti-C1 IA humano de conejo. Las únicas líneas de precipitación detectadas son obtenidas frente al antisuero de albumina antihumana proveniente del conejo. Estas experiencias testigo prueban pues que los medios utilizados para realizar el cultivo de células no contienen proteínas capaces de reaccionar con el anti-C1 IA antes de ser utilizadas para el cultivo de células.

Los medios MEM y los medios RPMI recogidos a partir de líneas de células no malignas y sometidos a una inmunoelectroforesis, no revelan ninguna línea de precipitación en presencia de antisuero anti-C1 IA humano del conejo.

En la prueba de inmunodifusión Ouchterlony, no existen ningunas líneas de precipitación en presencia de antisuero C1 IA humano proveniente del conejo.

De ello resulta que los cultivos testigo de células no malignas no liberan una cantidad detectable de C1 IA en los medios, cuando la detección es efectuada por inmunoelectroforesis e inmunodifusión.

#### 1715 - PURIFICACION DE LA C1 IAC/C1 PROVENIENTE DE FLUIDO PLEURAL/ASCITIS CANCEROSOS

Se centrifuga mediante la técnica descrita anteriormente en el apartado "Preparación de la C1 IAC", fluido pleural o ascítico

1720 procedente de enfermos afectados de un cáncer con metastasis en la pleura y/o ascitis, y se transfiere al precipitado hacia cultivos de células cancerosas, como se describe más arriba. Se deja coagular espontáneamente durante 2 horas a temperatura ambiente el líquido supernatante, eventualmente después de un almacenamiento a  $-20^{\circ}$  C. (véase más arriba). Seguidamente, se deja reposar durante toda una noche en un refrigerador para obtener una

1725 coagulación espontánea completa. Se centrifuga de nuevo el líquido supernatante a fin de eliminar la fibrina y se congela a  $-20^{\circ}$  C. hasta la próxima fase de purificación.

Se mezclan 2 ml de fluido pleural/ascítico tratado de este modo con 2,5 g de cambiador de aniones Séphadex A50 DEAE que fué precalentado a  $100^{\circ}$  C. durante 30 minutos y después enfriado a temperatura ambiente. Se agita la mezcla a  $8^{\circ}$  C. durante 1 hora. Seguidamente, se soloca la mezcla en una columna y se lave con

1730 5 veces 40 ml de NaCl 0,15 M estableciendo una aspiración en la parte inferior de la columna. La materia proteínica C1 IAC/C1 IA es absorbida en el cambiador de iones. Se lava la materia cambiadora de iones, en la columna, con 20 ml de NaCl, 2 M, y citrato trisódico, 0,01 M, pH 7,0.

El último eluato conteniendo C1 IAC/C1 IA se mezcla con sulfato de amonio saturado (pH ajustado a 7,0 con NaOH hasta obtener una saturación del 50% a  $8^{\circ}$  C. en una hora. Seguidamente, se efectúa una centrifugación (10 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente); después se añade al líquido supernatante sulfato de amonio (como se indicó antes a un pH de 7,0), hasta obtener una saturación del 65% a  $8^{\circ}$  C. en una hora. De nuevo, se efectúa una

1740 centrifugación (10 minutos a 3000 r.p.m. a temperatura ambiente). Seguidamente se efectúa el diálisis del precipitado conteniendo el C1 IAC/C1 IA durante 16 horas en presencia de agua destilada de 4 a  $6^{\circ}$  C. y después se vuelve a disolver en NaCl 0,15 M. Se liofiliza la solución, bien por una liofilización en coquilla, o

1745 bien por una liofilización bajo vacío con calefacción exterior, tal como se describe en el apartado con el título "Preparación

de la C1 IAC".

1755 El producto, que a partir de ahora llamaremos "C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A 50", está listo para ser utilizado en vacunas, o en mezcla con el producto C1 IAC/C1 IA,  $\alpha_2$ HS, Zn  $\alpha_3$ , orosomucoide, o solo, para la preparación de antisuero para ser usado en diagnósticos.

1760 - PURIFICACION DE LA C1 IA/C1 IAC CONTENIENDO OROSOMUCOIDE,  $\alpha_2$ HS GLICOPROTEINA Y Zn  $\alpha_3$  GLICOPROTEINA A PARTIR DE FLUIDO PLEURAL/ASCITIS.

1765 Se centrifuga del modo que se describe arriba en el apartado "Preparación de la C1 IAC", fluido pleural o ascítico procedente de enfermos portadores de cáncer con metastasis en la pleura y/o ascitis y se transplanta el precipitado hacia cultivos de células cancerosas como las que se han descrito más arriba. Se deja el líquido supernatante, eventualmente después de un almacenamiento a  $-20^{\circ}$  C, coagular durante dos horas a temperatura ambiente. Se saca el coágulo y se recentrifuga el fluido a 1200 r.p.m. a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se relarga el  
1770 fluido para hacer precipitar las proteínas contaminantes, estableciendo por ejemplo una saturación al 40% con la ayuda de sulfato de amonio saturado a  $0^{\circ}$  C. bajo agitación. En seguida, la continuación de las operaciones se efectúa de la misma forma y en las mismas condiciones que aquellas que se describen después del "relargage" descrito en el apartado arriba "Preparación del  
1775 C1 IAC", sub-título "Aislamiento de la C1 IAC", utilizando una columna cambiadora de aniones de celulosa Whatman DE-52 para la purificación final.

1780 La Figura 14 ilustra un ejemplo de una inmunoelectroforesis cruzada Freeman frente al suero antiproteína humana entero. El "Pico 1" es obtenido antes del tratamiento del fluido pleural, mientras que el "Pico 2" es obtenido sobre una fracción rica en C1 IA + C1 IAC procedente de una pasada sobre Dowex. Sobre la inmunoelectroforesis del "Pico 1", vemos que el pico que representa C1 IAC + C1 IA está relativamente elevado en relación a la  
1785

1790 mayoría de las otras proteínas (el pico muy alto es el de la albumina), lo cual indica el estado canceroso. En la parte del "Pico 2" podemos también detectar picos correspondientes a la orosomucoide y a la  $\alpha_2$ HS glicoproteína, aunque este sea débil (la identidad de la proteína en cada uno de los picos se determina de un modo seguro por inmunoelectroforesis cruzada paralela frente al antisuero específico).

1795 La Figura 20 muestra un ejemplo de una gráfica de primera elución sobre Whatman DE-52. La columna es una Pharmacia K 26/70, con un volumen de lecho de 2,6 x 70 cm, equipada con una conexión de desagüe. El pico correspondiente al C1 IAC + C1 IA es el pico 6.

1800 Las fracciones ricas en C1 IA/C1 IAC y las tres otras proteínas mencionadas arriba (cuya naturaleza se determina por inmunoelectroforesis llamada de "husada" (rocket) y Grabar -Scheidtger utilizando antisueros disponibles en el mercado frente a la  $\alpha_2$ HS glicoproteína, la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína y el orosomucoide, y el anti-C1 IA humano de conejo (un ejemplo de la inmunoelectroforesis de husada frente al antiorosomucoide viene ilustrado en la Figura 21), son reunidas, dializadas y liofilizadas como se describe más arriba.

1805 El producto resultante lo denominaremos "C1 IAC/C1 IA,  $\alpha_2$ HS, Zn  $\alpha_3$  orosom". Este producto está listo para ser utilizado como agente inmunogénico en una vacuna que es adecuada para vacunaciones de referencia (2ª y 3ª vacunaciones de los animales huéspedes), de preferencia en mezcla con otras proteínas descritas en el presente trabajo.

#### - VACUNACION DE ANIMALES HUESPEDES

1815 Se pueden elegir varios animales para vacunarlos con las vacunas conteniendo el producto que se describe arriba en calidad de agente inmunogénico para producir antisueros.

Hemos comprobado que los cerdos de la "Dansk Landrace" o de una mezcla de raza Yorkshire y de Dansk Landrace y los carne-

ros de la raza "Jysk Hederace" y de la raza Oxford Down facilitan  
1820 la especificidad óptima de anticuerpos frente a las proteínas que  
describimos arriba.

Los cerdos son seleccionados a la edad de 4 meses; se les  
hace una primera vacunación subcutánea en un lado del cuello,  
después se vigila su reacción a la vacunación. Cuando la reacción  
1825 es correcta, los sitios de vacunación quedan hinchados y ocasio-  
nalmente ulcerados (como heridas), al igual que en una respuesta  
positiva a la vacunación contra la viruela.

Además, la determinación del contenido y la determinación  
de la IgG sobre el suero del cerdo, se hacen del siguiente modo:

1830 - Contenido de anti-C1 IA: Se somete un suero humano esten-  
dar teniendo una concentración conocida de C1 IA (30 mg/ml  $\pm$  10%)  
a una inmunoelectroforesis de husada frente al 2% de anti-C1 IA  
humano de conejo (2 mg/ml) en el gel. Las husadas obtenidas de  
este modo se consideran standard y sirven ahora de referencia  
1835 comparadas con las husadas de inmunoelectroforesis de suero huma-  
no estandar frente a diluciones de antisuero de cerdo en gels. La  
dilución de antisuero de cerdo que proporciona la misma altura  
de husada que el gel conteniendo 2% de anti-C1 IA humano de cone-  
jo, contiene pues 2 mg/ml de anti-C1 IA humano de cerdo, y multi-  
1840 plicando por el factor de corrección correspondiente a la dilu-  
ción, se calcula el contenido de anti-C1 IA humano de cerdo.

- Contenido de anti-C1 IAC: Se sigue el mismo método, esta  
vez utilizando una solución estandar de C1 IAC Séphadex G75 Su-  
perfine en lugar del suero humano estandar. Se atribuye un con-  
1845 tenido de 2 mg/ml a una dilución de gel de suero de cerdo propor-  
cionando la misma altura de husada que los 2% de anti-C1 IA de  
conejo y se corrige el resultado para tener en cuenta la dilución.

- IgG: La concentración media de IgG en el suero de cerdo  
se determina por inmunoelectroforesis de husada del modo que des-  
1850 cribimos arriba, con un gel conteniendo el 4% de anti-IgG humano  
de conejo.

1855 3 semanas después de la primera vacunación, se administra por vía subcutánea una dosis de llamada de vacuna del otro lado del cuello. Se examinan seguidamente los cerdos y se estudia su suero del modo que se ha descrito arriba.

1860 Una segunda dosis de llamada se administra en el lomo, en parte por vía intramuscular profunda y en parte por vía subcutánea, 4 semanas después de la primera vacunación de llamada, 6 días después de la segunda vacunación de llamada se controlan de nuevo los cerdos de acuerdo con las indicaciones facilitadas arriba y se les determina el contenido de anticuerpo sanguíneo y la especificidad. Los valores medios normales después de la segunda llamada son de cerca de 2 mg/ml de anti-C1 IA, 2 mg/ml de anti-C1 IAC y alrededor de 1200 mg% de IgG.

1865 De 9 a 14 días después de la última vacunación, se deguelan los cerdos después de una descarga eléctrica en un matadero sanitario como se describe más adelante.

1870 Los carneros son vacunados en el cuello del mismo modo que se indicó cuando tratamos de los cerdos. Estos animales pueden servir de donantes por drenaje y pueden ventajosamente volver a ser vacunados y volver a servir varias veces. Los valores de contenido normal promedios, obtenidos en el carnero (determinados de un modo análogo según los métodos descritos más arriba), son de cerca de 1 mg/ml de anti-C1 IA, 3 mg/ml de anti-C1 IAC, y de cerca de 1500 mg% de IgG.

1875 . Ejemplos de vacunas preferidas

- Tipo 1

1880 La primera vacunación se efectúa con una cantidad total de 20 mg de proteína C1 IAC aglomerada + C1 IAC Séphadex G75 Superfina, disuelta en 1 ml de NaCl 0,15 M, y puesta en forma de emulsión acuosa en aceite con un volumen igual de coadyuvante completo de Freund.

Para hacer la dosis de llamada, se mezclan 20 mg de proteína C1 IAC aglomerada + C1 IAC Séphadex G75 Superfina, con

1885 20 mg de C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50 y 20 mg de C1 IAC/C1 IA,  $\alpha_2$ HS, Zn  $\alpha_3$ , orosomucoide. Se pone la mezcla en suspensión en 1 ml de NaCl 0,15 M y se lleva a la forma de emulsión en agua en aceite con un volumen igual de coadyuvante completo de Freund.

1890 Este producto de llamada es adecuado como dosis de primera y segunda llamadas para los cerdos y los carneros.

- Tipo 2

1895 La proteína C1 IAC aglutinada + C1 IAC Séphadex G75 Superfine se administra como producto de vacunación inicial a animales de producción del tipo del carnero o cerdo, utilizables para la preparación de antisuero a objeto de diagnóstico o de terapéutica.

1900 La dosis de llamada está constituida por C1 IAC/C1 IA DEA Séphadex A50 puesta en suspensión en 1 ml de NaCl 0,15 M, puesto bajo forma de emulsión agua en aceite con la ayuda de un volumen igual de coadyuvante completo de Freund. Esta vacuna puede servir para la dosis de llamada.

1905 Se deguellan los cerdos del modo siguiente. Primero se someten a una descarga eléctrica, después de la cual se encuentran en un estado de inconsciencia y son sangrados por medio de tubos en forma de embudos hacia botellas de Pyrex estériles de 5 l conteniendo 1 l de citrato del tipo ACD como agente anticoagulante. Sería posible emplear otros agentes anticoagulantes, por ejemplo la heparina, pero como la sangre del cerdo tiene una tendencia muy pronunciada a coagularse, preferimos utilizar el ACD. Después, se conserva la sangre en condiciones de baja temperatura, hasta el momento en que se utiliza.

1915 En el momento del tratamiento de la sangre, se hace la centrifugación del plasma en una centrifugadora refrigerada MSE Mistral 6L girando a 4000 r.p.m. El plasma es inmediatamente congelado a  $-20^{\circ}$  C. y se conserva a esta temperatura hasta el momento en el cual se efectúa el fraccionamiento en inmunoglobulina.

Antes de efectuar el fraccionamiento de las inmunoglobulinas, el plasma del cerdo es filtrado de modo estéril, por ejemplo con la ayuda de un filtro Millipore, cuya dimensión de poro disminuye hasta 0,22 u.

1920 Como método para la preparación de inmunoglobulina que contenga IGP, o inmunoglobulina que contenga cualquier otra de las diversas inmunoglobulinas se requieren diversos principios como precipitado de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , precipitado de Rivanol.

1925 Para la preparación de inmunoglobulinas con la especificidad deseada contra los tipos de antígenos descritos y sin agregación de inmunoglobulinas, deben seleccionarse los métodos, a fin de obtener los óptimos resultados y una concentración adecuada de inmunoglobulina.

#### - SISTEMAS DIAGNOSTICOS

1930 Para obtener un sistema de diagnóstico útil y seguro que permita establecer un diagnóstico diferencial entre enfermedades malignas y no malignas y seguir la evolución de una enfermedad maligna, al mismo tiempo respecto a estado no tratado y en función de diferentes tratamientos y durante el período de postratamiento (esta última para saber si existe una recaída del cáncer), un sistema diagnóstico de acuerdo con la presente invención es preferentemente un sistema con los siguientes requisitos:

1935

1º incluye el anti-C1 IAC humano o su producto de modificación o derivado activo bajo el punto de vista inmunológico, y está concebido y utilizado de tal modo que la reacción inmunológica con la C1 IAC en una muestra es fácilmente distinguible de toda respuesta a la C1 IA en la muestra. Esto es una necesidad fundamental que debe verificarse en todos los sistemas diagnósticos de acuerdo con la invención, en la medida en que es la presencia de la C1 IAC en la muestra procedente del paciente que indica sin ambigüedad que el enfermo sufre de un cáncer.

1940

1945

2º da una indicación del nivel total de C1 inactivador (C1 IA + C1 IAC) en la muestra, y

3º da una indicación del nivel de C4 en la muestra.

- 1950 Al igual que hemos explicado arriba, los niveles de suero de inactivador C1 (C1 IA + C1 IAC) y C4 constituyen indicaciones útiles respecto a la evolución de cáncer probado y la evolución en el curso del período de postratamiento, y además, un elevado nivel de inactivador C1 muestra la presencia de un cáncer, véase la
- 1955 Figura 2. Sin embargo, la presencia de una tasa elevada de inactivador C1 no constituye una prueba concluyente de una enfermedad cancerosas, porque, del mismo modo ciertas afecciones víricas pueden provocar una fuerte elevación de los niveles de inactivador C1, que, además, pueden ser acompañados por niveles de C4 elevados
- 1960 En el caso de dichas enfermedades por virus no malignos, el nivel de inactivador C1, aunque elevado, no incluiría C1 IAC, por tanto es un sistema de diagnóstico que suministra una distinción segura entre tales enfermedades no malignas y el cáncer, al mostrar de modo selectivo la presencia de C1 IAC en la muestra.
- 1965 La Figura 4 ilustra un sistema diagnóstico preferido de acuerdo con la invención susceptible de cumplir las tres condiciones anteriores. El sistema incluye una placa de vidrio u otro soporte adecuado 1 sobre el cual se colocan tres secciones de capas de gel (2, 3 y 4) con distintos antisueros. En las capas de gel, se efectúan agujeros 5 con el porta objetos o con la ayuda de otra técnica adecuada. En la sección 2 de gel, se incorpora una substancia conteniendo anti-C1 IAC humano. Esta substancia puede ser un suero oligoespecífico que sea sensible, al mismo tiempo a la C1 IAC y a la C1 IA, pero que las distinga (por ejemplo, un suero preparado a partir de carnero utilizando una vacuna de tipo 2 como aquella que se describe en el apartado "Vacunación de los Animales Huéspedes"); en este caso, una muestra de suero procedente de un donante con buena salud o de un enfermo que sufra de una enfermedad no maligna, solamente dará lugar a un anillo de precipitación, mientras que un suero procedente de enfermos cancerosos proporcionará dos anillos de precipitación.
- 1970
- 1975
- 1980

1985 Es preferible, no obstante, que la materia conteniendo el anti-C1 IAC humano incorporado en el gel de la sección 2, sea una materia anti-C1 IAC humano monoespecifico, por ejemplo preparada por la absorción de anticuerpos frente a cualquier otra proteína del suero humano a partir de una materia conteniendo anti-C1 IAC humano por incubación con el suero global procedente de donantes en perfecta salud, seguida de una separación como la que describimos abajo.

1990 En el caso en que la sección 2 incluya una tal substancia monoespecifica en C1 IAC humano, la reacción a una muestra de suero de enfermo canceroso en la sección 2 será un anillo simple alrededor del orificio en el cual la muestra fué aplicada, mientras que con un donante de buena salud, o que sufra de una enfermedad no maligna, se verificará una ausencia total de anillos de precipitación alrededor del orificio en el cual se aplicó la muestra. Se considera que esta es la reacción más característica y la menos ambigua que se puede obtener. En la Figura 4 "F5 INA" indica una tal materia conteniendo anti-C1 IAC humano monoespecifico, preparado por absorción a partir de un antisuero producido en el carnero.

1995

2000

2005 En la sección 3, una materia conteniendo anti-C4 humano está incorporada en el gel, por ejemplo un anti-C4 humano de conejo, industrial. En la sección 4, se incorpora en el gel un "inactivador C1" antihumano; es por ejemplo el anti-C1 IA humano del conejo, el cual, como se ha descrito anteriormente, no es capaz de distinguir la C1 IAC de la C1 IA y que por lo tanto dá lugar a la precipitación con la totalidad de la C1 IA y con C1 IAC (si está presente) en la muestra de suero aplicada. Evidentemente que,

2010 en las secciones 3 y 4, igualmente la materia con actividad inmunológica presentando la reacción buscada puede ser una modificación o un derivado del anticuerpo natural, con la condición de que presente las reacciones inmunológicas, características con C4 y C1 IA, respectivamente. Las secciones 3 y 4 sirven para calcular cuantitativamente los niveles de C4 y de inactivador C1,

2015

respectivamente.

2020 Como se puede ver en la Figura 4, la sangre que proviene de un donante de buena salud no da ningún anillo de precipitación en la sección FS INA, mientras que se ven anillos de precipitación de diámetros relativamente pequeños en las secciones anti-C4 y anti-C1 IA, correspondiendo a valores normales reducidos de C4 y C1 IA. El suero del enfermo N° 1 da un anillo de precipitación en la sección FS INA, lo cual demuestra que el paciente sufre de un cáncer. En la sección anti-C4, el anel de precipitación

2025 presenta un gran diámetro e indica elevados niveles de C4 en el suero, y también se aprecia en la sección anti-C1 IA un gran anillo de precipitación que muestra que la tasa de inactivador C1 (C1 IA + C1 IAC) en el suero del paciente es elevada. El suero del paciente N° 2 proporciona grandes anillos de precipitación

2030 en las secciones anti-C4 y anti-C1 IA, y en cambio no proporciona ningún anillo de precipitación en la sección FS INA. Esto muestra que el paciente no sufre de un cáncer, sino que presenta niveles de inactivador C1 y de C4 anormalmente elevados, lo cual puede ser debido, por ejemplo, a una infección vírica.

2035 Se prepara del modo siguiente un sistema diagnóstico preferido del tipo ilustrado por la Figura 4: se calienta 1% de agarosa en tampón diemal, pH 8,6 hasta que se encuentre fluida (otros gels, como el agar y otros tampones pueden también ser utilizados, pero la asociación indicada en el presente proporciona excelentes

2040 resultados). Seguidamente se enfría el gel a 45° C. y se le añade el antisuero. Un antisuero adecuado para la sección anti-C4 está compuesto por el anti-C4 humano de conejo empleado preferentemente en la proporción del 1%. Para la sección anti-C1 IA, el anti-C1 IA humano de conejo proporciona excelentes resultados cuando se utiliza una cantidad preferentemente del 1%. Para la sección

2045 anti-C1 IAC, la materia preferida (dando un anillo de precipitación únicamente en el caso de cáncer) es el anti-C1 IAC humano de carnero (absorbido si es necesario), añadido en la proporción

del 0,25% (la preparación del anti-C1 IAC humano de carnero  
2050 (absorbido) viena descrita detalladamente más adelante).

Cuando se haya añadido el anticuerpo o el antisuero, se  
echa cada porción distinta de gel según la configuración deseada  
en el soporte, después dejamos que el gel se solidifique a tem-  
peratura ambiente. Cuando el gel esté sólido, se practican agu-  
2055 jeros en la cantidad y de acuerdo con un modelo buscado, por  
ejemplo como el que se muestra en el diseño, y se marcan las  
secciones de gel de modo apropiado, si se desea. Se embalan co-  
rrectamente los sistemas diagnósticos y se les provee de un modo  
de empleo acompañado de fotografías indicando las respuestas ca-  
2060 racterísticas, así como curvas de graduación estandar permitien-  
do determinar el nivel en el suero de C4 y de inactivador C1 a  
partir del diámetro del anillo de precipitación formado.

Naturalmente que se pueden efectuar varias modificaciones  
al proyecto y a la técnica arriba mencionados. Por ejemplo, se  
2065 puede poner cada uno de los gels sobre un soporte separado, y  
se pueden utilizar varios otros modelos además del que viene in-  
dicado en el diseño. Se trata de modificaciones insignificantes  
y obvias para el experto. Asimismo, se pueden utilizar otros so-  
portes que no sean el gel descrito más arriba. Sin embargo, la  
2070 puesta en práctica que describimos arriba permite obtener resul-  
tados excelentes y sin ambigüedad en la práctica.

Se prepara el anti-C1 IAC humano del carnero (absorbido),  
utilizado en la técnica arriba indicada, del modo siguiente: se  
añaden a 10 ml de anti-C1 IAC humano de carnero, preparado tal  
2075 y como se describe en el apartado "Vacunación de los Animales  
Huéspedes", (con la ayuda de la vacuna del tipo 2) y teniendo  
una concentración de inmunoglobulina de 1500 mg<sup>g</sup> de IgG y un  
contenido en anticuerpo específico de 3 mg/3 ml, se añaden 400  
microlitros de suero de donante humano (el cual evidentemente  
2080 no fué inactivado en caliente); se incuba la mezcla a 37° C. du-  
rante 30 minutos. Seguidamente, se efectúa una centrifugación a

3000 r.p.m. y se incuba el líquido supernatante a 4° C. y se vuelve a centrifugar de nuevo. El líquido supernatante procedente de la última centrifugación sirve de anti-C1 IAC humano del carnero (absorbido).

2085

- DESBLOQUEO EXTRACORPORAL Y DESENMASCARAMIENTO DEL SUERO DE UN CANCEROSO

En una central de desbloqueo utilizando anticuerpos INA inmovilizados, se eliminan las proteínas bloqueantes y de desmascaramiento del suero de un canceroso por una inmunoadherencia a los anticuerpos. De acuerdo con los aspectos preferidos de la presente invención, los anticuerpos inmovilizados incluyen generalmente por lo menos anticuerpos frente a la C1 IAC, eventualmente también frente a C1 IA y preferentemente igualmente anticuerpos frente a la orosomucide, a la  $\alpha_2$ HS glicoproteína y a la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína. Aunque se pueda, de acuerdo con la invención, utilizar en calidad de anticuerpo inmovilizado frente a la C1 IAC y a la C1 IA, un anticuerpo que no las distinga, como es el caso del anti-C1 IA humano de conejo, preferimos de un modo muy especial poner en práctica los anticuerpos específicos frente a la C1 IAC y C1 IA preparados del modo descrito en la presente y sobre animales huéspedes, de los cuales sabemos que el suero es mejor tolerado por los seres humanos, y hasta el momento no existe ninguna prueba de que el uso simultáneo de anticuerpos frente a la orosomucide, a la  $\alpha_2$ HS glicoproteína y a la Zn  $\alpha_3$  glicoproteína no sea ventajoso; es por este motivo que preferimos utilizar un INA en el tratamiento extracorporal del suero de un canceroso, que presenta la misma composición en anticuerpo que el INA preferido utilizado para la administración por vía intravenosa.

2090

2095

2100

2105

2110

Se preparan de preferencia anticuerpos inmovilizados en matriz según la presente invención con la ayuda de CNBr-Sépharose 4B, procedente de Pharmacia. Esta sustancia viene descrita en la

2115 publicación "Affinity Chromatography, Principles and Methods",  
publicada por Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, Octubre  
1914, en especial en las Páginas 8-15 y 57-58. Evidentemente que  
se pueden utilizar otras sustancias matrices que permitan inmo-  
vilizar correctamente los anticuerpos sin dañar su actividad y  
que presenten buenas propiedades de elución. Demos ahora un ejem-  
2120 plo de inmovilización de INA por asociación a la CNBr-Sépharose  
4B y de desbloqueo y desensamblamiento del suero de un enfermo  
poseedor de cáncer:

Se preparan 30 mg de INA liofilizado y puesto en suspensión,  
preparado sobre un cerdo con la ayuda de una vacuna del tipo 1 de  
2125 acuerdo con el modo descrito en el apartado "Vacunación de los  
Animales Huéspedes"; se aplica este INA a la CNBr-Sépharose 4B de  
acuerdo con la técnica de la publicación indicada en el párrafo  
anterior.

La matriz activada por la INA que se obtiene de este modo  
2130 se coloca en una columna Pharmacia K 15/25. Se equilibra la co-  
lumna con una solución tampón Tris/HCl (0,2% pH 8) conteniendo  
0,5 M de NaCl.

Se envían en esta columna 10 ml de suero procedente de un  
canceroso y se efectúa la elución con tampón Tris/HCl 0,2 M, pH  
2135 8,0 y conteniendo 0,5 M de NaCl. Se controlan las fracciones  
eluidas por vía espectrofotométrica y se recogen las fracciones  
conteniendo las proteínas. La identificación y la determinación  
cuantitativa de la relación C1 IAC/C1 IA son efectuadas por una  
inmunolectroforesis de tipo "husada" según Laurell sobre el sue-  
2140 ro canceroso antes del tratamiento en la columna y sobre las  
fracciones eluidas.

Se ha comprobado que el contenido inicial de inactivador de  
C1 (C1 IAC / C1 IA) es de 50 mg% en el suero inicial y desciende  
a un valor de 15 a 20 mg% después del tratamiento. (Se efectúan  
2145 los cálculos en las fracciones contenidas en el efluente de Tris,  
pero se hace una corrección para tener en cuenta la dilución).

Después de la elución, se prepara la columna para una nueva prueba mediante elución con una solución de glicina/HCl (0,2 M, pH 2,8) conteniendo 0,5 M de NaCl, y después haciendo pasar una  
2150 solución salina isotónica y equilibrando con tampón Tris/HCl 0,2 M (pH 8,0) conteniendo 0,5 M de NaCl.

En la terapia práctica del cáncer empleando el desbloqueo extracorporal con la ayuda de anticuerpo INA inmovilizados, se efectúa ventajosamente el tratamiento del suero del paciente en  
2155 una central a la que se envía el plasma del enfermo canceroso después de la plasmáferesis del paciente. La Figura 22 muestra una unidad o central de desbloqueo de acuerdo con la invención. En esta figura 22, un saco 1 contiene el plasma del paciente con citrato (plasma ACD); se vacía en un depósito de recalcificación  
2160 2 en el cual la recalcificación es efectuada a 37° C. durante 30 minutos. El suero atraviesa un filtro 3 que retiene el coágulo de fibrina y pasa por el conducto 4 hasta la columna 5 refrigerada a 8° C. por medio de un envolvente refrigerante. La columna contiene el INA inmovilizado en una matriz, por ejemplo el INA  
2165 aplicado sobre una CNBr-Sépharose 4B cargada de INA del modo que describimos más arriba. Ya hemos añadido a la columna antibióticos en la cantidad adecuada. Se calcula la dimensión de la columna y la carga de INA de tal modo que la columna contenga un exceso de anticuerpos inmovilizados en relación al contenido en antígenos correspondientes en el suero.  
2170

La elución de la columna se efectúa con la ayuda de tampón Tris/HCl 0,2 M (pH 8,0) conteniendo 0,5 M de NaCl, tal como se describe más arriba; el eluato atraviesa una cubeta 6 y va hacia un depósito 7. Se estudia el eluato atravesando la cubeta 6 por  
2175 medio de un espectrofotómetro 8 asociado a un aparato de registro 9. Cuando el examen espectrofotométrico indica que todas las proteínas del suero están eluidas, se bombea el eluato del depósito 7 por medio de una bomba 10 y se le envía hacia un dializador bajo presión 11, por ejemplo una unidad funcionando según el prin-

- 2180 cípio del riñón. El suero que sale del dializador de presión 11 pasa por un conducto 12 provisto de una válvula 13 que permite sacar una muestra y va hacia un filtro estéril 14; se la recoge en este lugar en una bolsa estéril 15 para volver a inyectársela al enfermo. Se estudian las muestras sacadas por la válvula 13
- 2185 para determinar el contenido en C1 IAC/C1 IA y cromomucide,  $\alpha_2$ HS glicoproteína y  $\alpha_3$  glicoproteína, por inmunoelectroforesis y el contenido en impurezas por medio de técnicas adecuadas como por ejemplo, la cromatografía en fase gaseosa para el CNBr. Se pueden asimismo efectuar otros análisis de control similar en otras fases, como por ejemplo una cromatografía en fase gaseosa antes de dializar bajo presión. Es preferible efectuar todas las manipulaciones sobre el suero antes del filtro estéril, siendo las únicas operaciones efectuadas después del filtro estéril el control de esterilidad y la determinación del contenido
- 2190 de pirógeno. Después del paso del suero, se regenera la columna 5 con glicina/HCl y se equilibra con el tampón Tris. El eluato procedente del tratamiento glicina/HCl y la puesta en equilibrio es evacuado, por ejemplo por el conducto 16.
- 2195 Se efectúan varios exámenes relacionados con el desbloqueo. Por ejemplo, se controla la esterilidad y se determina el contenido en pirógeno del plasma cuando este llega a la central, y se determina el contenido en fibrina y en productos de escisión de la fibrina en el paciente. Igualmente se comprueban los niveles de C4 y de inactivador de C1 en el suero en muestras sacadas del
- 2200 enfermo y se designan los linfocitos para los tipos B, T y O. A parte de esto, se efectúan las pruebas estandar de laboratorio, del mismo modo que en el tratamiento con los citostáticos.
- 2205 Es muy importante determinar en el paciente el factor de coagulación, en la medida en que una parte de los productos de coagulación es eliminada en la conversión de plasma en suero. No obstante, los cancerosos presentan con frecuencia niveles importantes de fibrina. Si ello es necesario, el factor de coagulación es administrado al enfermo, por ejemplo por infusión de plasma
- 2210

donante o en forma de Lysofibrine (Novo).

2215

La presente invención se basa en el descubrimiento de que en las pruebas de precipitación inmunológica en los sueros de los pacientes empleando por ejemplo antisuero de oveja (FS INA) preparado tal como se ha indicado más arriba, o preparado según la pequeña modificación descrita más abajo, algunas muestras de sue-

2220

ro presentan además de la precipitación propia de C1 IAC, una precipitación marcadamente distinta del precipitado de C1 IAC, y que en una inmunoelectroforesis del modo descrito arriba, empleando, después de hacer girar el campo eléctrico 90°, primero una muestra de gel de agarosa que contiene anti-C1 IA humano de cone-

2225

jo, e inmediatamente (situado detrás del anti-C1 IA humano de conejo) un gel que contiene anti-C1 IAC/C1 IA humano de cerdo, un precipitado distinto se desarrolla en el gel que contiene antisuero de cerdo, lo cual indica que está presente una nueva proteína junto con el C1 IAC/C1 IA en la muestra pero no habrá pre-

2230

cipitado por el anti-C1 IA humano de conejo.

Estos hallazgos indican la existencia de un antígeno que bajo ciertas circunstancias parece acompañar a C1 IAC, y que denominamos CAAC (complejo antígeno asociado al cáncer). Una de las diferencias fácilmente apreciables entre C1 IAC y CAAC está en que mientras que C1 IAC pierde sus propiedades inmunológicas (su habilidad para precipitar con sus anticuerpos en las pruebas inmunológicas) al ser tratada térmicamente (56° C. durante 30 minutos), CAAC retiene su habilidad de precipitar con el anticuerpo incluso después de ser calentado a 60° C. durante 30 minutos.

2235

2240

Actualmente se han comprobado los siguientes datos referentes a CAAC:

1) Electroforesis en gel de agarosa.

2245

En una electroforesis en gel de agarosa, la posición del precipitado de CAAC, queda totalmente dentro del área  $\gamma$ . Ello indica que CAAC muestra una carga eléctrica negativa relativamente fuerte, y que no es una inmunoglobulina (el precipitado de immuno-

globulina está en el área  $\gamma$  a  $\beta$ ), y que no es idéntico a C1 IAC/C1 IA, cuyo precipitado se encuentra en el área  $\gamma_2$ .

2) Inmunolectroforesis.

2250 En la prueba de inmunolectroforesis, CAAC precipita con su correspondiente anticuerpo incluso después de un calentamiento previo a 60° C. durante 30 minutos, mientras que los precipitados de C1 IAC y C1 IA parece que desaparecen con un calentamiento alrededor de 56° C. durante 30 minutos.

2255 3) Ciclos de temperatura.

Se ha comprobado que la resistencia de CAAC, respecto a C1 IAC es superior respecto a repetidos ciclos de congelación.

4) Ultracentrifugación preparatoria.

2260 En la preparación por ultracentrifugación a 4° C. con gravitación de 178, 880 G, CAAC está presente en el supernatante, pero no se encuentra en la fracción de lipoproteína. Ello sucede en los diversos fluidos probados, como suero del paciente, plasma y fluidos pleurales o ascíticos.

2265 5) El tratamiento con neuraminidasa parece que anula la habilidad de CAAC para precipitar con su correspondiente anticuerpo.

CAAC retiene su habilidad de formar precipitado con su correspondiente anticuerpo en las pruebas inmunológicas, después de exposición a valores de pH del orden de 7 - 8,6.

2270 El hecho de que se ha comprobado que CAAC da lugar a precipitados en las pruebas inmunológicas indicadas demuestra que el antisuero empleado en los experimentos contenía anticuerpos capaces de precipitar con CAAC. Ello indica que CAAC tiene que haber estado presente en la vacuna originariamente administrada al animal huésped en cuestión para preparar el antisuero. Puede asegurarse que se ha localizado CAAC empleando antisuero preparado tal como se ha descrito antes empleando C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50, mientras que no es seguro si las vacunas que no contienen este material dan lugar a la formación de anticuerpos contra CAAC.

2275

2280 Esto por su parte indica que en la preparación de C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50, el CAAC sigue a C1 IAC/C1 IA en los diversos procesos de cambios de iones y de separación de sales descritos en la sección "Purificación de C1 IAC/C1 IA a partir de fluidos pleurales o ascíticos en los pacientes de cáncer".

2285 Dado que la vacuna arriba descrita, muy a menudo se ha preparado empleando cultivos de células cancerosas y fluidos pleurales o ascíticos de un reducido número de pacientes, y como que todos los antisueros producidos empleando C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50 como parte de la vacuna se ha comprobado que son capaces de dar el típico precipitado de CAAC (que incluso aparece después de calentar la muestra a 60° C. durante 30 minutos)

2290 con muestras de suero de paciente que contienen CAAC, esto indica que CAAC se halla siempre presente en la vacuna, lo cual a su vez significa que CAAC está prácticamente presente en una proporción significativa en el contenido de proteínas de fluidos pleurales y/o ascíticos.

2295

Como se ha indicado antes no todas las muestras de suero de pacientes cancerosos presentan contenido de CAAC, o por lo menos no todos los contenidos que pueden ser demostrados por los métodos de pruebas inmunológicas conocidas hasta ahora, pero basándonos en las conclusiones indicadas, parece ser que los fluidos de

2300 pacientes cancerosos tendrán con gran probabilidad elevada proporción de CAAC. Esto hace probable que el tejido de pacientes de áreas o zonas en que se han infiltrado células cancerosas, contienen CAAC. También puede indicar que cuanto más activo es

2305 el cáncer mayor cantidad de CAAC se encuentra en el suero de pacientes. Los hallazgos a que se ha llegado actualmente confirman que: en inmunodifusión comparativa de Manzini un anillo de precipitación CAAC de amplio diámetro, a menudo coincide con un estadio activo de cáncer.

2310 Basándonos en estos descubrimientos, puede decirse que CAAC es un antígeno asociado al cáncer y se estima que es una proteína

o una sustancia muy similar a una proteína de baja antigenicidad en el sistema humano CAAC no es una inmunoglobulina, pero no puede excluirse que CAAC sea un antígeno que consista en una combinación de inmunoglobulina con una proteína o complejo de proteínas, como por ejemplo C1  $\phi$ . También es posible que CAAC sea una sustancia precursora de C1 IAC.

Como el tratamiento por calor (a 56° durante 30 minutos) de una vacuna preparada sin el contenido indicado de C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50 da lugar a un producto que no es capaz de dar ningún precipitado con el antisuero preparado de cerdo u oveja, empleando vacunas que comprenden C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50, mientras que el tratamiento por calor de tipos de vacuna que contienen C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50 da lugar a un producto que en cada caso individual parece capaz de dar precipitado con antisuero preparado con una vacuna que no ha sido calentada que contiene C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50, esto constituye otro indicativo de que es el C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50 parte de una vacuna que contiene una proporción significativa de CAAC y da lugar a la formación de anticuerpos contra CAAC.

Para la preparación de un antisuero con especificidad contra CAAC, pero no contra C1 IAC/C1 IA, se ha previsto emplear una vacuna para su administración a los animales huéspedes, que ha sido preparada con incorporación de C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50, pero que antes de ser administrada al animal huésped ha sido tratada a la temperatura y tiempos indicados, que como se sabe destruyen la propiedad de precipitar de C1 IAC/C1 IA, por ejemplo 56° C. durante 30 minutos o bien 60° C. durante 30 minutos. Dichos antisueros o anticuerpos con especificidad, contra CAAC serán valiosos materiales de diagnóstico y pueden ser empleados en varias pruebas descritas antes para los anticuerpos de C1 IAC. También se ha previsto que los anticuerpos con especificidad contra CAAC serán de utilidad en la terapia del cáncer de modo análogo a los anticuerpos C1 IAC descritos en la Patente Principal.

2345 La pequeña modificación indicada en el procedimiento de preparación de antisueros y anticuerpos, objeto de este Certificado de Adición y de la Patente Principal correspondiente, consiste en emplear como vacuna para los animales huéspedes una proteína agregada C1 IAC + C1 IAC/C1 IA DEAE Séphadex A50.

2350 Un Método de diagnóstico que actualmente se estima muy práctico es una inmunodifusión Manzini comparativa.

El antisuero empleado para ello corresponde a "PS INA" preparado con la modificación de vacuna que se ha indicado. El gel más adecuado es Litex HSA 222, (por ejemplo 2% en un tampón diemal) añadiendo bacteriostáticos, por ejemplo 0,1% de ácido de sodio.

2355 Una distancia óptima entre los orificios practicados en el gel es 2 mm. entre las periferias de cada orificio, el diámetro de los orificios es de 5 mm.

2360 El segundo Certificado de Adición relativo a: "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 451.109, por: METODO DE OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL CANCER", cuyo privilegio de explotación en España se solicita, deberá reunir las particularidades que se concretan en las siguientes,

2365 REIVINDICACIONES

1ª.- "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL Nº 451.109, por: METODO DE OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL CANCER", caracterizados por el hecho de que en pruebas de precipitación inmunológica de sueros de pacientes cancerosos, tales como gel que contiene anti-C1 IAC/C1 IA se produce un nuevo precipitado, que acompaña al C1 IAC y al que se designa como GAAC (complejo antígeno asociado al cáncer) el cual es una proteína que se diferencia de la C1 IAC por su facultad de precipitar con el anticuerpo incluso después de ser calentado a 60º C. durante 30 minutos, y por poder estar expuesto a pH del orden de 7 - 8,6.

2380 2ª.- "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL  
Nº 451.109, por: METODO DE OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS  
PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL CANCER", caracterizados por  
el hecho de que para preparar anticuerpos y anticuerpos especifi-  
cos de CAAC se inmuniza a un animal huésped con una vacuna que  
comprenda una cantidad suficiente de CAAC, empleando para ello  
01 IAG/01 IA Séphadex A50, inactivado por calentamiento a 36º C.  
2385 durante 30 minutos, y después se recoge el suero del animal inmu-  
nizado que contiene el anti CAAC específico.

3ª.- "PERFECCIONAMIENTOS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL  
Nº 451.109, por: METODO DE OBTENCION DE ANTISUEROS Y ANTICUERPOS  
PARA DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL CANCER".- Tal como se ha des-  
crito y demostrado en los dibujos adjuntos.

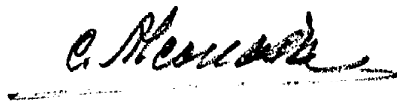
Consta de setenta y cinco hojas foliadas y mecanografiadas  
por una sola cara.

Barcelona a

P.A. de Dr. Kurt Baskgaard OSTER

D. Juan B. Renter Ridaura

P.P.



Ig A-IgG (o IgM)

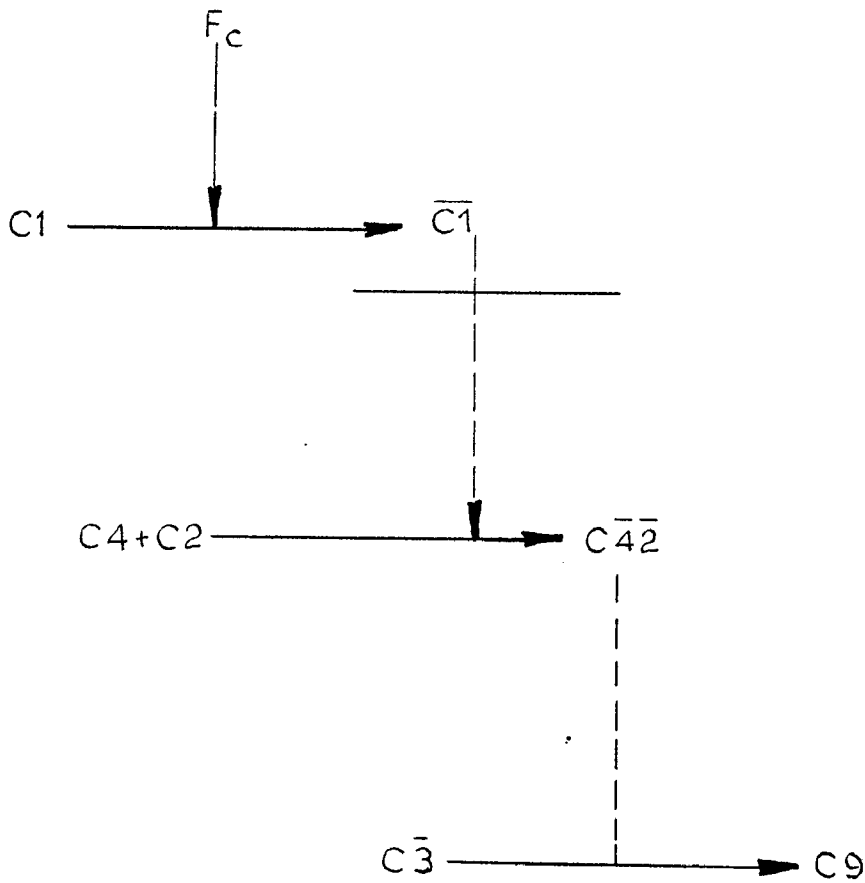


Fig.1

Barcelona 6 Octubre 1976  
P.A. Juan B. Rentería  
Juan B. Rentería Ridaura

Escala variable



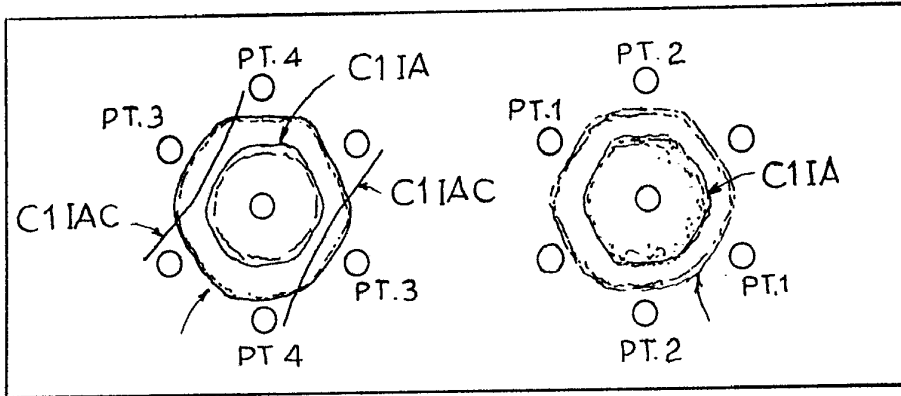


Fig.3

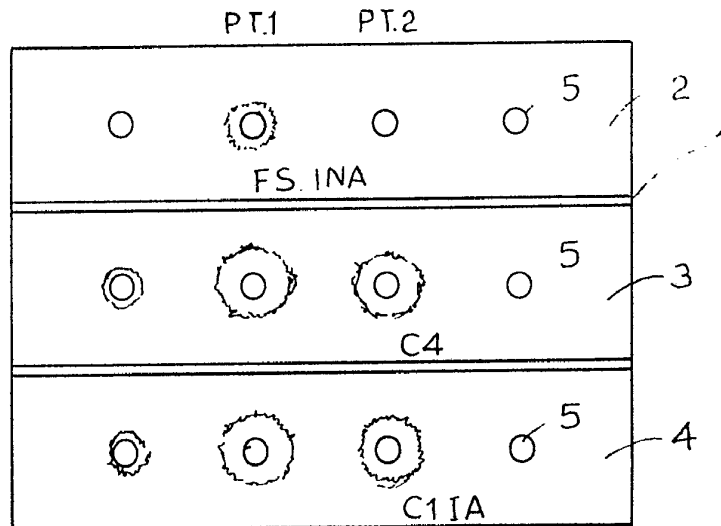


Fig.4

*Barcelona & Oaxaca 1976*  
*Juan B. Rentería*  
*Juan B. Rentería*

*Escala variable*

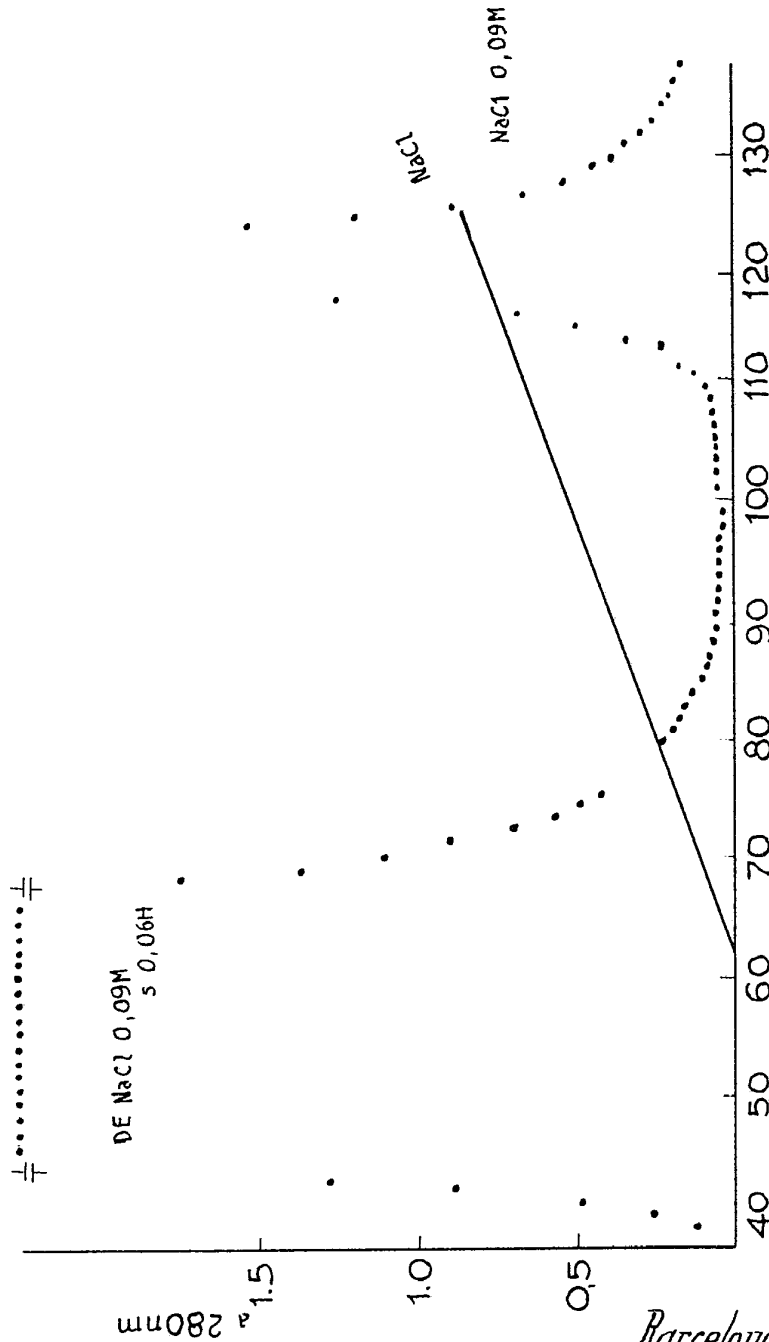


Fig.5

Barcelona 6 Octubre 1976

P.A. *[Signature]*  
Juan B. Renter Ridaura

Éscala variable

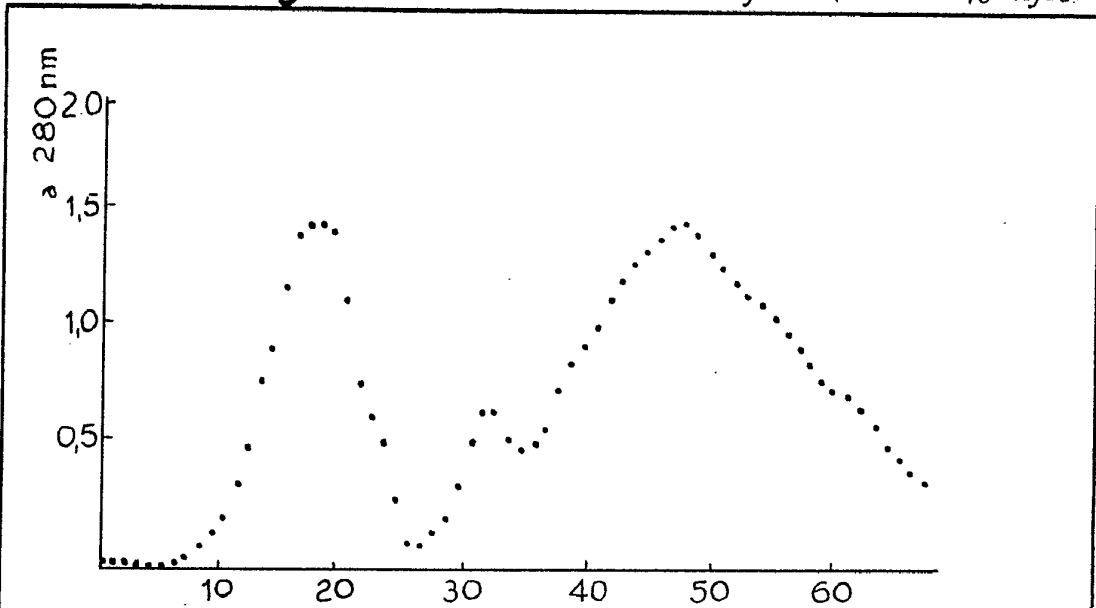


Fig. 6

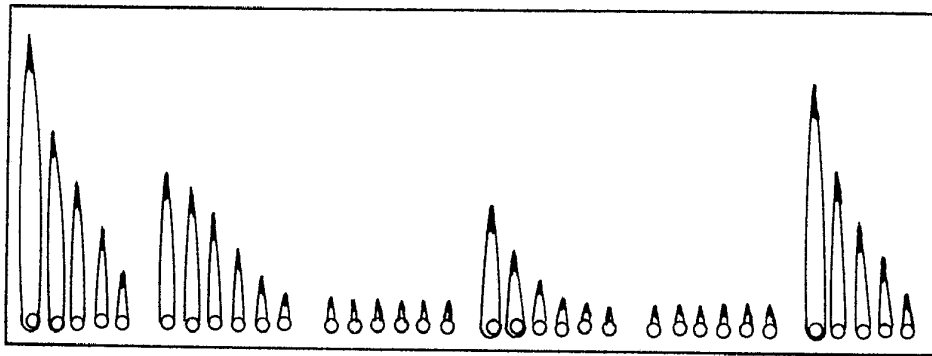


Fig. 7

Barcelona 6 Octubre 1976

*P.A. Juan B. Rentería*  
*Juan B. Rentería*

Escala variable

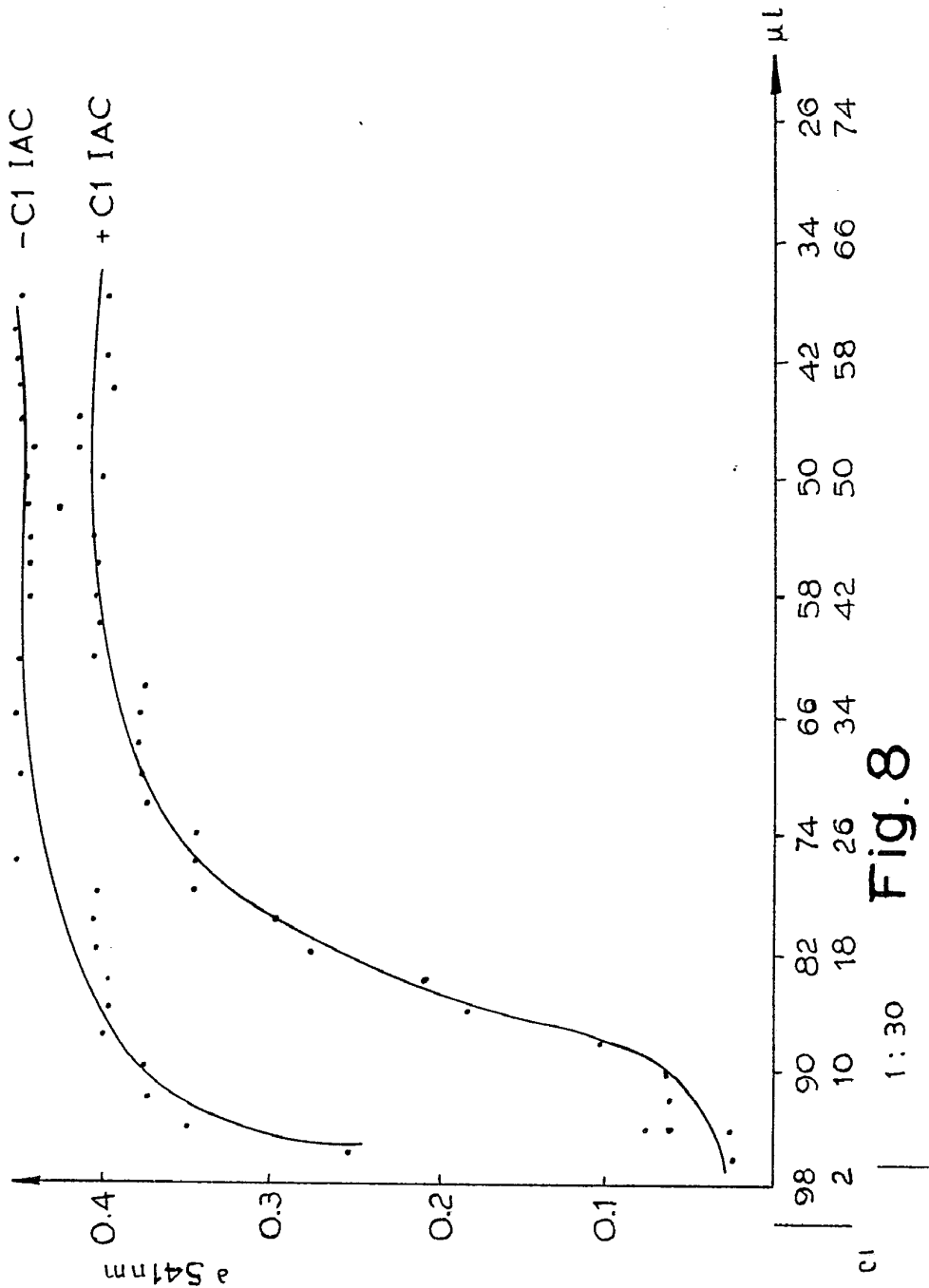


Fig. 8

Barcelona 6 Octubre 1976  
P. Al...  
Juan B. Renter Ridaura

Escala variable

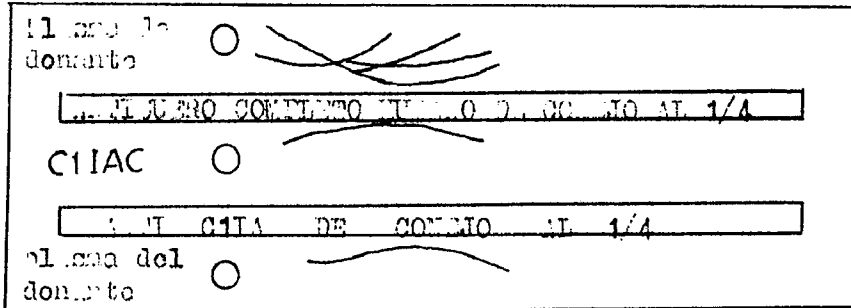


Fig.9

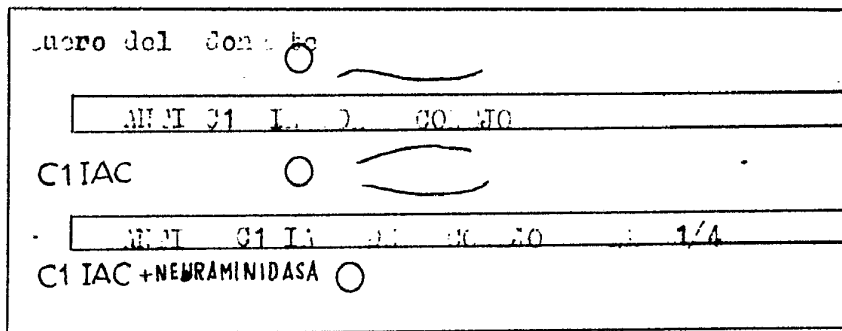


Fig.10

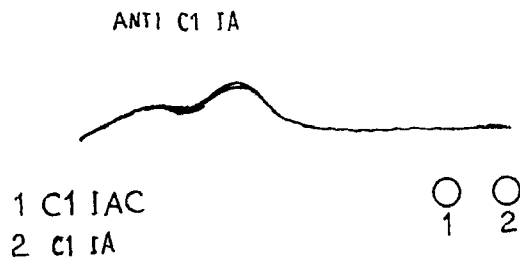


Fig.11

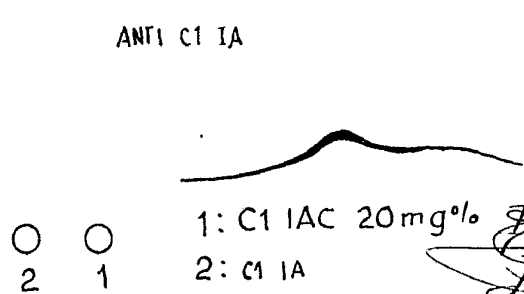


Fig.12

Barcelona 6 Octubre 1976

*Juan B. Kenter Ridaura*

Escala variable



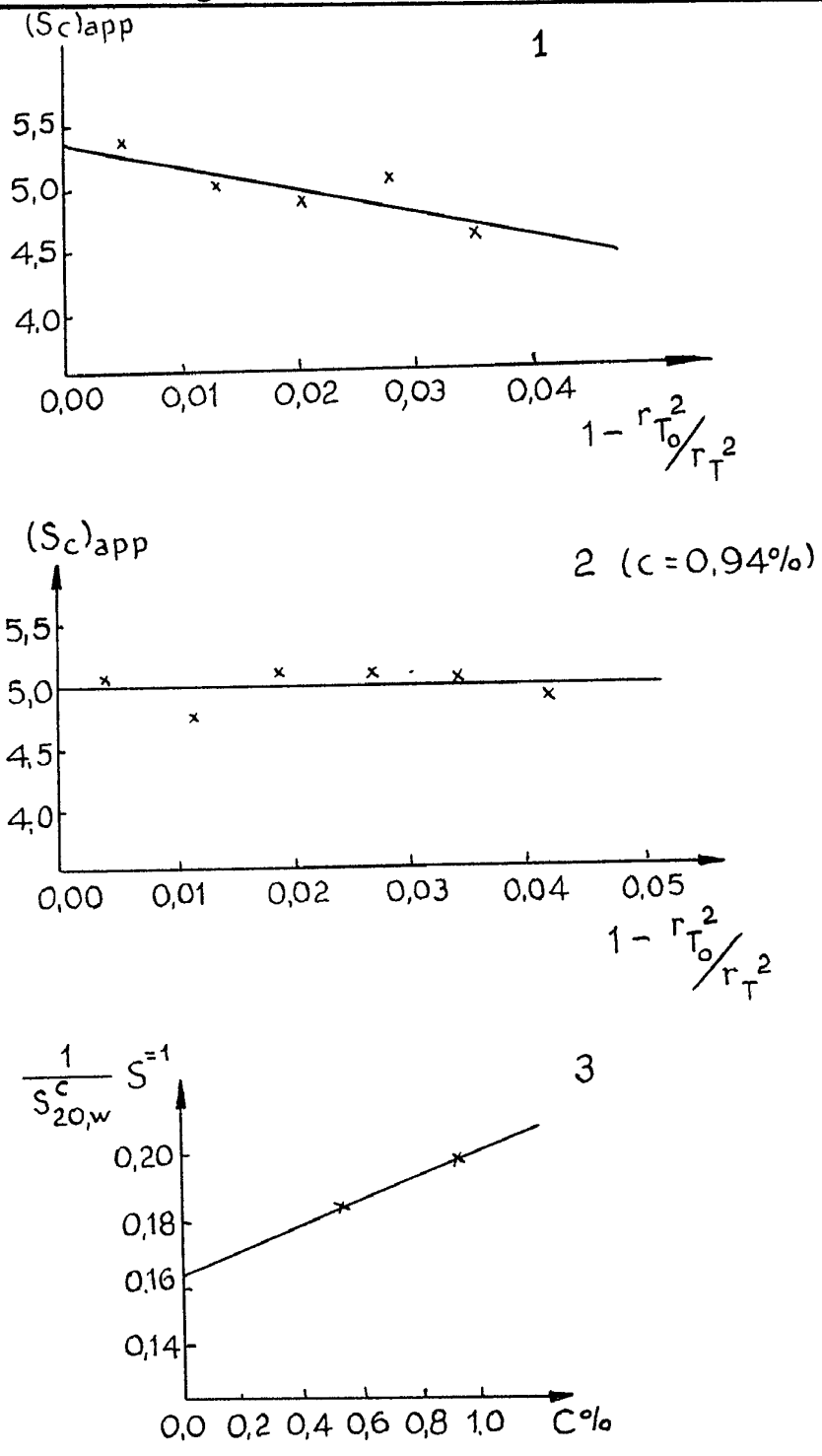
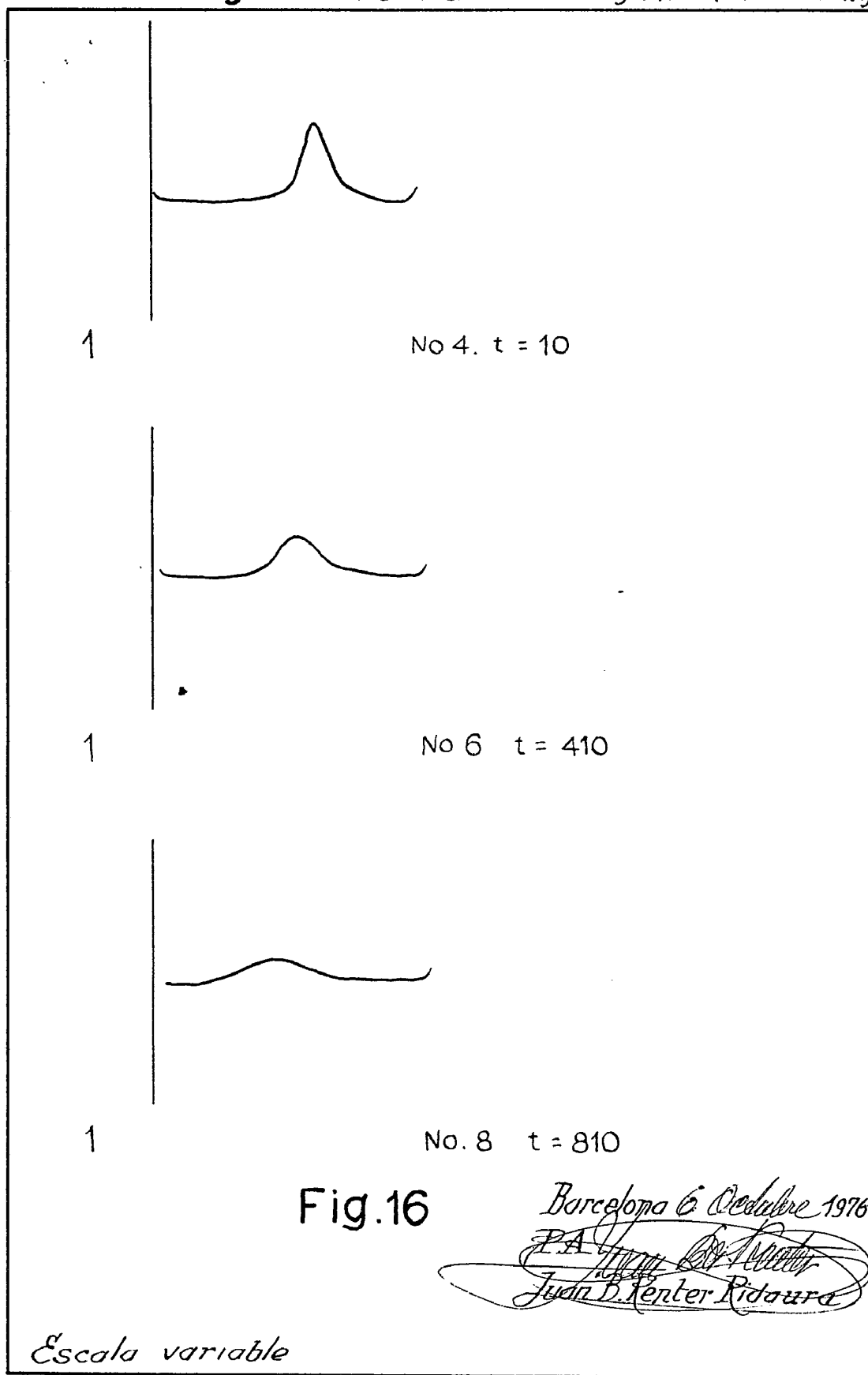
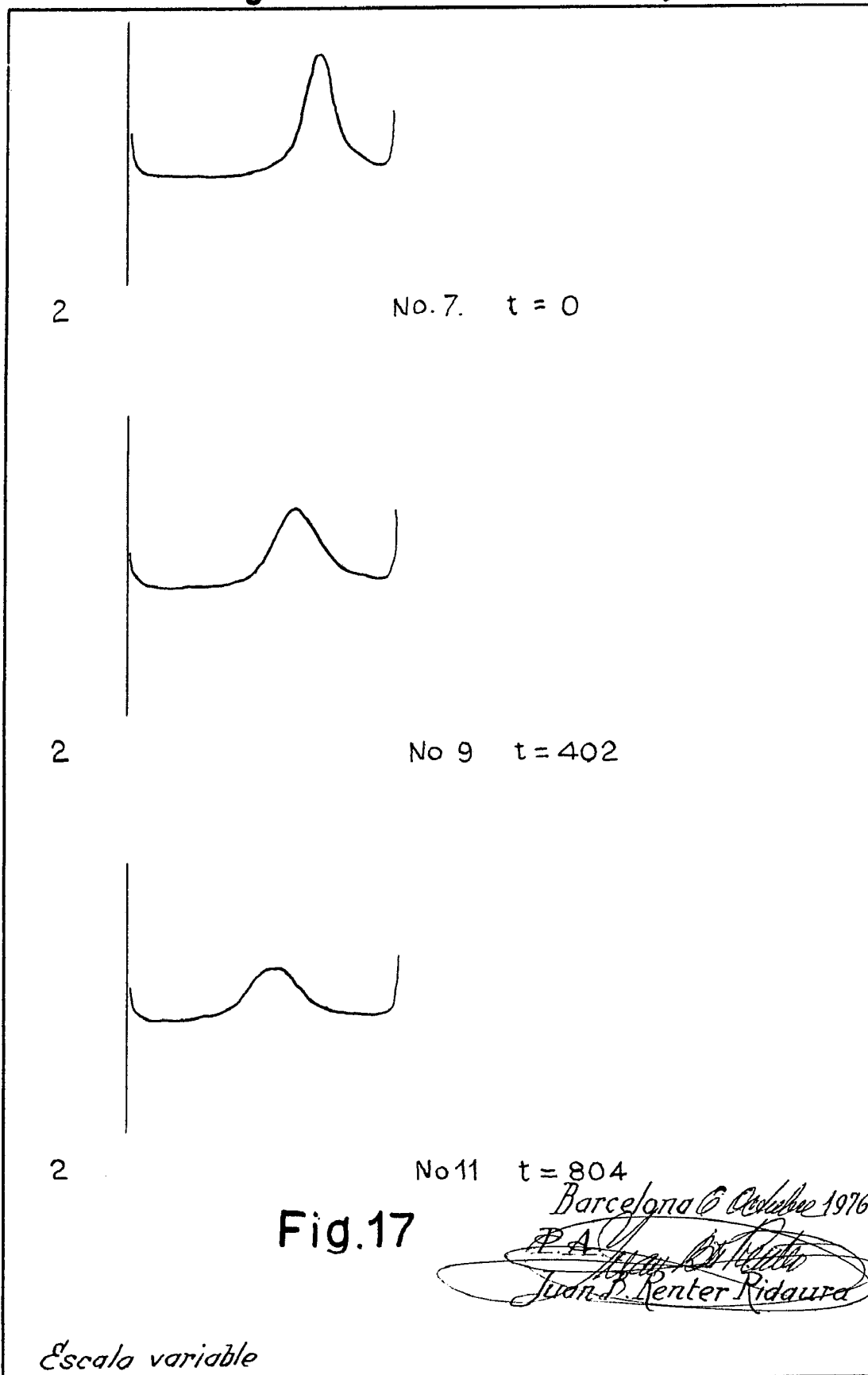


Fig.15

Barcelona & Cadalaxe 1976  
 P.A. *Juan B. Rentería*  
*Juan B. Rentería Ridaura*

Escala variable





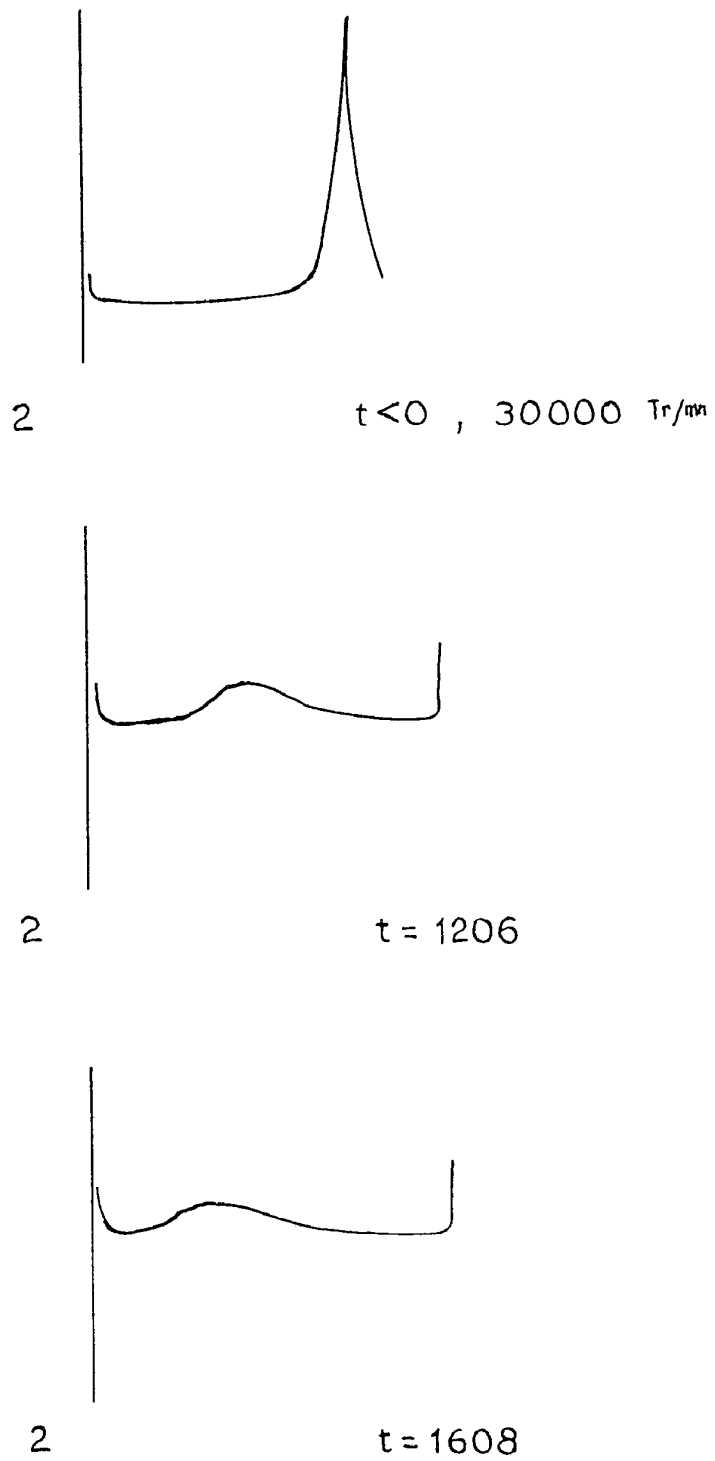


Fig. 18

Barcelona 6 Octubre 1976  
P.A. ~~Juan B. Rentería~~  
Juan B. Rentería

Escala variable

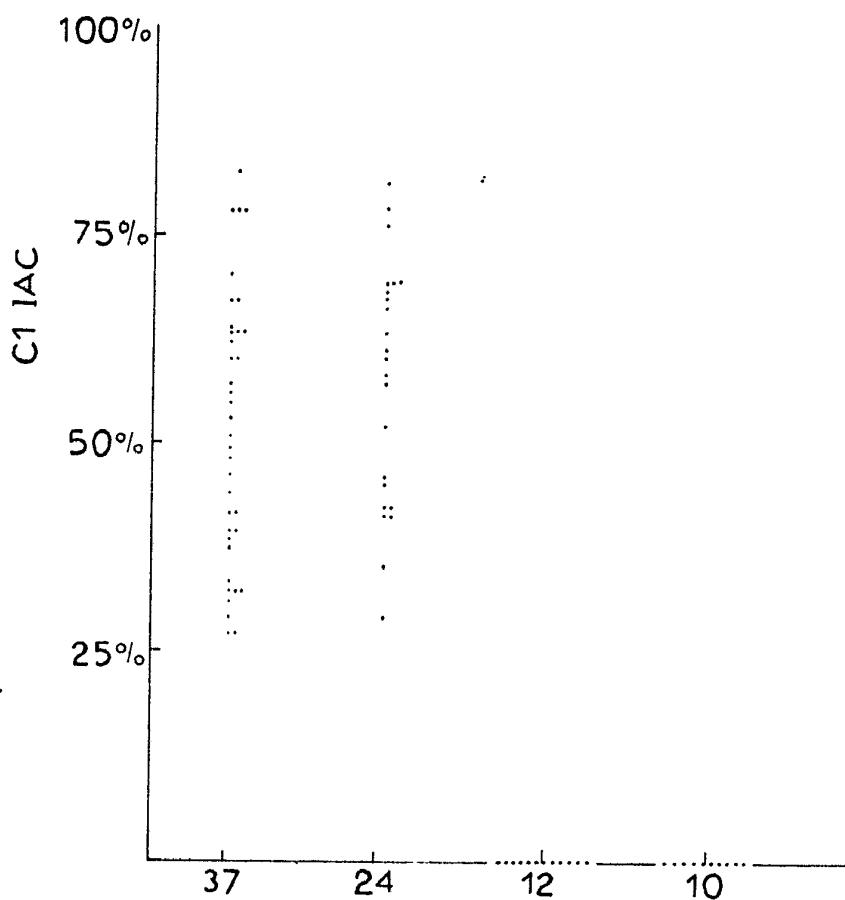


Fig. 19 Barcelona a Barcelona 1976

*Juan B. Rentería Ridaura*

Escala variable

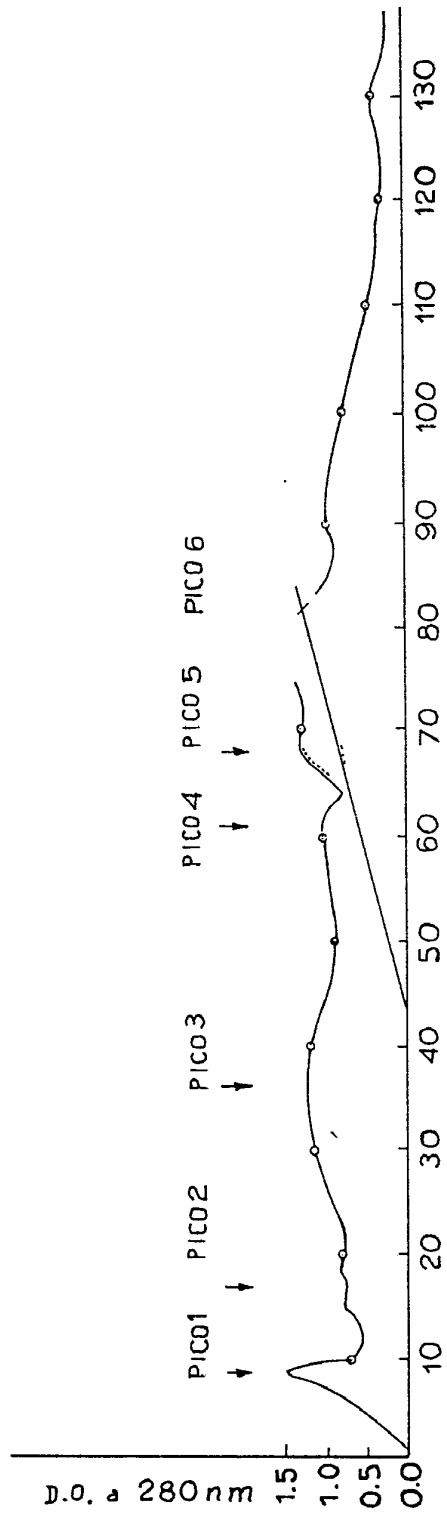


Fig. 20

Barcelona 6 Octubre 1976

*Juan B. Rentería Ridaura*

Escala variable

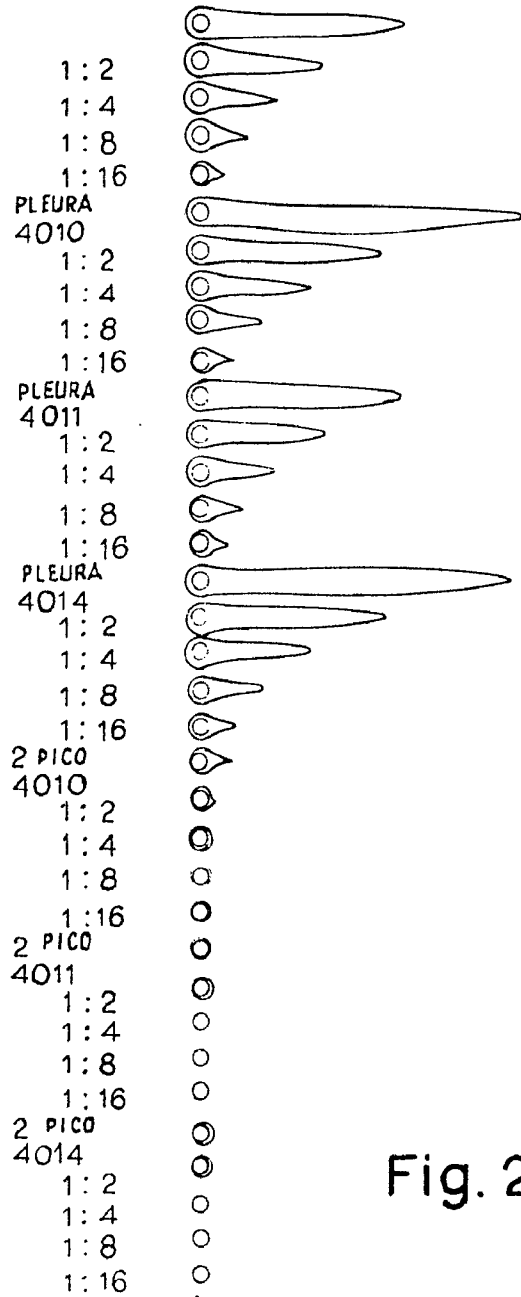


Fig. 21

Barcelona 6 Octubre 1976  
D.A. *Juan B. Rentería*  
*Juan B. Rentería*

Escala variable

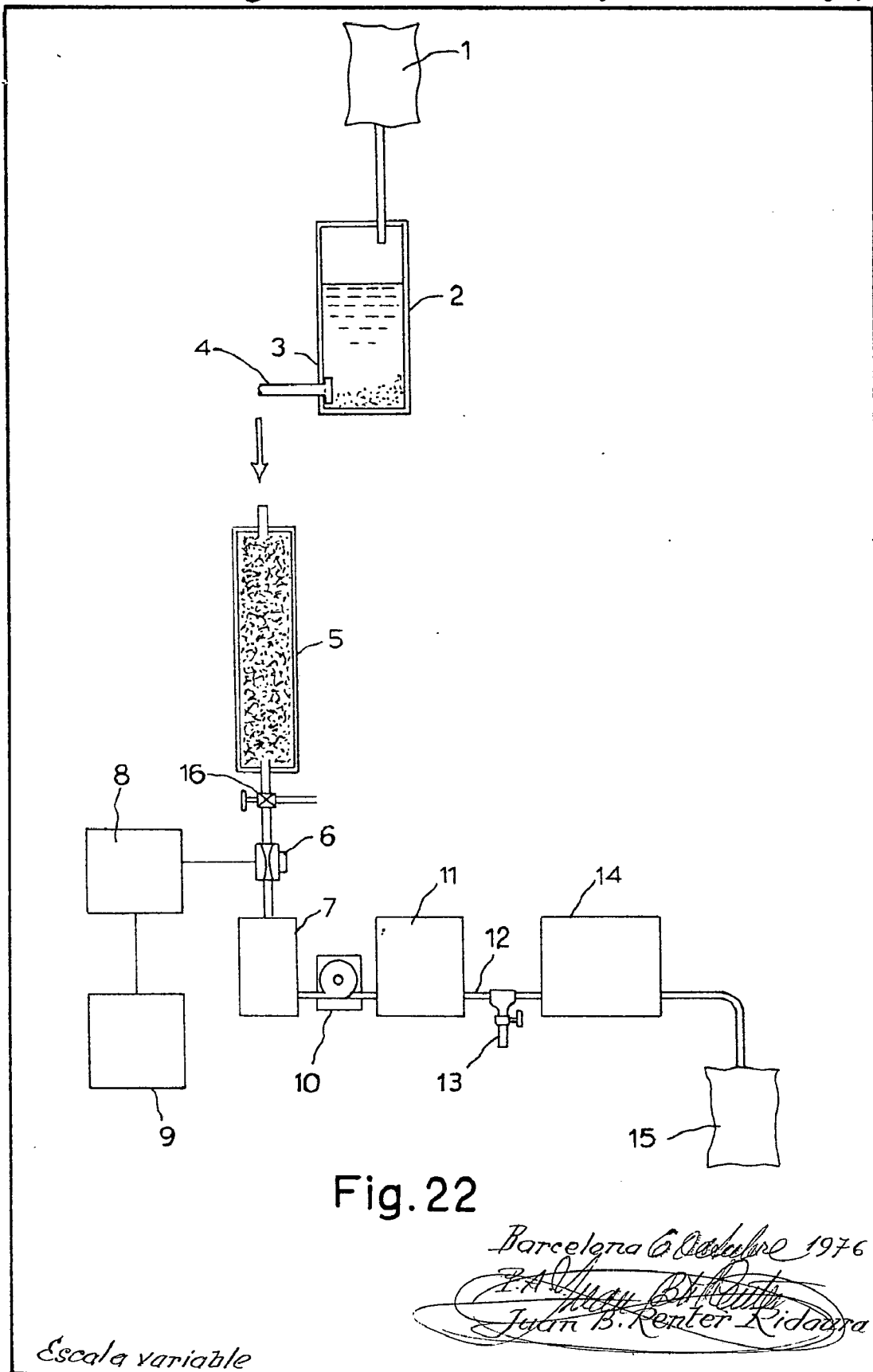


Fig. 22

Barcelona a Octubre 1976

*Juan B. Rentería Ridaaga*

Escala variable