



(19) ES	(11) NUMERO	459164	(10) A1
	(21)		
	(22) FECHA DE PRESENTACION	26-5-77	

RAN 4093/13

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
690.454	27 Mayo 1976	U.S.A.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N	

(64) TITULO DE LA INVENCION

"METODO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE MELANOMAS Y CARCINOMAS EN EL CUERPO HUMANO"

(71) SOLICITANTE (S)

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

BASILEA (Suiza)

(72) INVENTOR (ES)

José Ramon Marti
David Marshall Parks Thompson

(73) TITULAR (ES)

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE. S.A.

(74) REPRESENTANTE

D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un método para detectar melanomas y otros tumores del cuerpo humano evaluando la inhibición de la adherencia de los leucocitos

5. inducida por antígenos, la cual es causada por una inmunidad celular tumoral específica.

La inmunidad celular tumoral ha sido demostrada mediante experimentos realizados con tumores transplantados en ratas y ratones. Por ejemplo, Halliday y otros., Int. J.

10. Cancer, volumen 9, páginas 477-483 (1972) prepararon una prueba sencilla de inmunidad celular llamada Inhibición de la Adherencia de Leucocitos (Leucocyte Adherence Inhibition).

Dicha prueba se basa en la comprobación de que al adicionar extractos tumorales se inhibe específicamente la adhesión

15. al vidrio de los leucocitos peritoneales si éstos proceden de ratones que han sido sensibilizados previamente contra el tumor específico. Holan y otros, Cellular Immunology, volumen 13, páginas 107-116 (1974), utilizando tumores transplantados en ratas, ratones y conejos de indias demostraron

20. también que se producía el mismo fenómeno con células macrófagos. Grosser y otros, Cancer Research, volumen 35, páginas 2571-2579 (1975) demostraron que el cáncer de mama puede ser detectado en las personas enfermas evaluando la inhibición de la adherencia de los leucocitos inducida por antígenos,

25. la cual es causada por una inmunidad celular tumoral específica. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones encaminadas a encontrar la forma de utilizar principios inmunitarios con fines de diagnóstico y posible curación de diversos cánceres humanos. La existencia de una reacción inmu-

- nitaria al melanoma maligno en el enfermo ha sido demostrada recientemente por Lewis y otros, British Medical Journal, volumen 3, páginas 547-552 (1969); Oren y otros, Clin. Exp. Immunol., volumen 9, páginas 45-46 (1971); Cochran y otros, Lancet, volumen 1, páginas 1340-1341 (1972); de Vries y otros, Int. J. Cancer, volumen 9, páginas 567-576 (1972); Hellstrom y otros, Int. J. Cancer, volumen 11, páginas 280-292 (1973); Hoppner y otros, Int. J. Cancer, volumen 11, páginas 245-260 (1973) y Hollinshead y otros, Cancer, volumen 34, páginas 1235-1243 (1974).

- Si bien se han obtenido algunos buenos resultados con modelos animales con tumores transplantados, los métodos inmunológicos para descubrir melanomas malignos no han servido para proceder a exámenes en gran escala. Es conocido en general que en las primeras fases de las enfermedades malignas existen mecanismos inmunológicos de defensa, y se ha demostrado que tales mecanismos de defensa actúan en las personas que padecen melanomas malignos, pero no se han elaborado métodos basados en dicho principio que sean apropiados para realizar exámenes en gran escala.

- Lo ideal sería que el examen para descubrir melanomas malignos consistiese en un examen sanguíneo sencillo, específico y reproducible y que detectase la enfermedad con la suficiente prontitud para que la enfermedad pudiese todavía ser curada.

Hemos descubierto que el producto del mecanismo inmunológico de defensa del cuerpo humano contra los tumores malignos, es decir, los carcinomas, sarcomas, melanomas, etc., puede ser detectado en un estadio lo suficientemente temprano

no de la enfermedad para que ésta sea todavía curable. El método empleado para detectar el mecanismo inmunológico de defensa consiste en un examen de sangre sencillo, específico al tumor maligno, es decir, al melanoma, y da resultados reproducibles. Por "melanoma maligno" se entiende un tumor maligno constituido por masas negras de células con una marcada tendencia a la metástasis.

El procedimiento según el invento comprende la recogida de leucocitos de sangre venosa heparinizada del paciente, la suspensión de una determinada cantidad de leucocitos en una solución tamponada seguida de la mezcla de los leucocitos con extractos de tumores malignos de melanoma, y la utilización de un control formado por extractos de tejidos de personas que padezcan de tumor benigno de mama, adenocarcinoma de mama, diversas enfermedades benignas o en las que no se hayan detectado tumores malignos. Después de aplicar procedimientos de incubación apropiados, se cuenta el número de células que no se adhirieron en cada caso a las paredes del tubo de ensayo y se mide la inhibición de la adherencia de los leucocitos como índice de no adherencia (INA). Este determina la existencia o ausencia de melanoma maligno.

El índice de no adherencia se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Porcentaje de células no adheridas en presencia de un antígeno específico}}{\text{Porcentaje de células no adheridas en presencia de antígenos no específicos}} \times 100$$

Porcentaje de células no adheridas en presencia de un antígeno no específico

Se recogen los leucocitos y se cuentan por métodos ya conocidos, por ejemplo, con el hemocitómetro. La muestra

- heparinizada de sangre se incubaba a una temperatura de alrededor de 37°C durante 1 hora y se recoge la fracción de plasma. Tal fracción es rica en leucocitos. Se separan éstos por centrifugación y se hace una suspensión de los mismos en una solución tampón isotónica. Todos los eritrocitos restantes son objeto de lisis. A continuación se separan los leucocitos mediante centrifugación y se suspenden en un medio acuoso apropiado formando una concentración celular de 1×10^7 /ml.
- 5.
10. Los extractos tumorales se preparan homogenizando las muestras tumorales (o muestras de tejidos normales) en suero fisiológico tamponado con un pH 7,3, centrifugando el homogenizado y recogiendo el flotante que resulta. De preferencia, la solución tampón es suero fisiológico tamponado con fosfato. Es necesario que el pH sea básico pues si fuese ácido destruiría la actividad del antígeno. Para poder ser empleados en este examen, los extractos han de estar diluidos con un medio acuoso apropiado, preferentemente Medium 199 (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland).
15. La dilución óptima para este ensayo se obtiene determinando la concentración de antígeno tumoral que produce el mayor incremento entre la inhibición específica y no específica de la adherencia de los leucocitos.
20. El extracto de tumor maligno de melanoma es el material antigénico que ocasiona la inmunidad por mediación de células. Los antígenos empleados para los controles no específicos que se describen en la presente pueden detectarse también mediante el procedimiento del invento utilizando los controles no específicos apropiados. Por ejemplo,
- 25.

pueden detectarse también los cánceres de ovario, vejiga, cerebro y pulmones.

- El examen se efectúa mezclando partes alícuotas de una pequeña cantidad de suspensión de leucocitos sanguíneos que contiene alrededor de 1×10^7 leucocitos/ml, con pequeñas cantidades separadas de solución tampón de antígeno de melanoma maligno, o un antígeno diferente en recipientes de vidrio separados. Se completa luego la mezcla hasta un volumen predeterminado. A continuación se incuba cada mezcla en el recipiente de vidrio colocado de modo que su contenido cubra al menos las tres cuartas partes de su superficie interna. Se incuba a alrededor de 37°C durante el tiempo suficiente para que la reacción, si la hubiera, se efectúe completamente, bajo una atmósfera de aire y 5 % de CO_2 . Una vez que la reacción ha tenido lugar, se agita el contenido y se cuenta el número de células no adheridas al vidrio.
- 5.
- 10.
- 15.

- Las partes alícuotas de suspensión de leucocitos son preferentemente muy pequeñas, en general alrededor de 0,1 ml. La concentración de leucocitos es tal que el resultado del recuento de las células es significativo y permite efectuar fácilmente una prueba de reacción con el material antigénico. El tampón utilizado para la dilución es Medium 199 con un pH 7,2-7,4.
- 20.

- La cantidad de extracto de antígeno empleada, es preferentemente, de 0,1 ml del extracto diluido. El extracto se diluye en general con Medium 199. La dilución del extracto de antígeno concentrado, en volumen, puede ser 1 parte de extracto de antígeno por 4 a 16 partes de diluyen-
- 25.

to. De preferencia se utiliza una dilución de 1 parte por 4 partes.

5. El volumen final de la mezcla de leucocitos y antígeno para el ensayo es, con ventaja, de 0,5 ml. El diluyente empleado para llegar a dicho volumen es Medium 199.

10. Los recipientes de vidrio apropiados son de cualquier tamaño y forma que sean adecuados. Por razones de comodidad de empleo y de facilidad de obtención se prefieren tubos de ensayo Pyrex o Kinax (Fisher Scientific, Montreal, Canadá) de 20 ml. La incubación se realiza con los tubos de ensayo en posición horizontal en un soporte que los inmoviliza. La inmovilización reviste una importancia crucial, pues el movimiento durante la incubación puede falsear los resultados del examen. La incubación dura preferentemente 15. cerca de dos horas. La incubación puede durar más, pero ello no hace que el examen sea más exacto ni que la reacción sea más completa. También se puede incubar durante un período 20. más corto, pero éste no será óptimo. Se pueden emplear, por tanto, periodos de incubación de aproximadamente 1 a 3 horas.

Las células que no se adhieren se cuentan empleando cualquier método apropiado, por ejemplo, un hemocitometro.

25. Según el procedimiento aplicado en este invento, se ha encontrado que la reacción de los leucocitos de un paciente a los extractos de melanomas malignos no depende del origen del extracto. Los extractos procedentes del paciente examinado o extractos preparados a partir de melanomas malignos de otros enfermos proporcionan resultados equivalentes. Esto indica que los leucocitos de un paciente con mola-

noma maligno presentan una inmunidad por mediación celular que es específica a todos los melanomas malignos del mismo tipo y no es influida por el origen del antígeno.

A continuación se exponen algunos ejemplos para que se comprenda mejor el invento.

5.

Ejemplo 1.

Se recibieron muestras de un tumor de melanoma maligno operado y se colocaron en un recipiente estéril. Se diseccionaron tejidos grasos y fibrosos de la muestra y se cortaron finamente con unas tijeras afiladas en suero fisiológico glacial tamponado con fosfato (0,15 M de tampón de fosfato, 0,15 M de suero fisiológico) con pH 7,3. La materia resultante se homogeneizó durante 10-15 minutos en cinco volúmenes de suero fisiológico glacial tamponado con fosfato a 40.000 r.p.m. en un homogeneizador Vir Tis 45. Se centrifugó el homogeneizado a 20.000 veces la gravedad durante 30 minutos y se recogieron los flotantes y se almacenaron a -40°C en pequeñas partes alicuotas (2 ml). Se prepararon de manera idéntica extractos de cancer de mama, cancer de vejiga y otros tumores, como cáncer de ovario y de pulmón y se utilizaron como controles en el procedimiento según el invento. Las concentraciones de proteína de los extractos de copa eran 6-8,5 ng/ml. A los efectos del ensayo, los extractos fueron descongelados y diluidos a 1:4 en volumen con Medium 199. El Medium 199 está comercializado por Microbiological Associates, Bethesda, Maryland y se compone de:

15.

20.

25.

<u>Componentes</u>	<u>ng/litro</u>
<u>Aminoácidos</u>	
L-alanina	25,0

	Clorhidrato de L-arginina	70,0
	Acido L-aspártico	30,0
	Clorhidrato de L-cisteina	0,1
	L-cistina	20,0
5.	Acido L-glutámico	67,0
	L-glutamina	100,0
	Glicina	50,0
	Clorhidrato de L-histidina H ₂ O	22,0
	Hidroxi-L-prolina	10,0
10.	L-isolucina	20,0
	L-leucina	20,0
	Clorhidrato de L-lisina	70,0
	L-metionina	15,0
	L-fenilalanina	25,0
15.	L-prolina	40,0
	L-serina	25,0
	L-treonina	30,0
	L-triptófano	10,0
	L-tirosina	40,0
20.	L-valina	25,0
	<u>Vitaminas</u>	
	Acido p-aminobenzoico	0,050
	Acido ascórbico	0,050
	D-biotina	0,010
25.	Calciferol	0,100
	D-Ca-panto tenato	0,010
	Colesterol	0,200
	Cloruro de colina	0,500
	Acido fólico	0,010

	i-Inositol	0,050
	Menadióna	0,010
	Nicotinamida	0,025
	Acido nicotínico	0,025
5.	Clorhidrato de piridoxal	0,025
	Clorhidrato de piridoxina	0,025
	Rivoflavina	0,010
	Clorhidrato de tiamina	0,010
	DL-alfa-tocoferofosfato (Na ₂)	0,010
10.	Tween 80 [†]	5.000
	Acetato de vitamina A	0,140
	<u>Otros componentes</u>	
	Clorhidrato de adenina 2H ₂ O	12,10
15.	Acido adenosin-5'-monofos- fórico, dihidrato (AMP) (Acido adenílico muscular)	0,20
	5'-trifosfato de adenosina tetrahidrato disódico (ATP)	1,08
	Deoxiribosa	0,50
	Dextrosa	1000,00
20.	Glutaciona (reducida)	0,05
	Clorhidrato de guanina H ₂ O	0,33
	Hipoxantina	0,30
	Rojo de fenol	20,00
	Ribosa	0,50
25.	Acetato sódico.3H ₂ O	83,00
	Tinina	0,30
	Urácilo	0,30
	Xantina	0,34

[†]Marca registrada de la Atlas Powder Company - polioxietileno-(20)-sorbitán-monoleato.

	<u>Salas inorgánicas</u>	<u>mg/litro</u>
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	186,0
	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,7
	KCl	400,0
5.	KH_2PO_4	60,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,0
	NaCl	8000,0
	NaHCO_3	1400,0
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	90,0
10.	El todo con un pH 7,2 a 7,4	

Ejemplo 2

Preparación del reactivo para leucocitos

Se extrajo sangre a pacientes con melanomas malignos y a individuos de control y se la depositó inmediatamente a 4° C. Después de que se hubiese producido la contracción del coágulo durante la noche, se separó el suero y se conservó a -40° C. Estas muestras de sangre consistían en sangre heparinizada obtenida de pacientes con melanomas malignos y de personas de control con cánceres de vejiga o de mama y diversas enfermedades no malignas u otros tumores malignos inconexos. El diagnóstico de existencia de melanoma maligna en los pacientes designados como padeciendo este mal fue confirmado histológicamente. El diagnóstico clínico de todos los controles y tumores malignos inconexos fue confirmado mediante exámenes histológicos de muestras quirúrgicas. Se tomaron muestras de 20 ml de sangre heparinizada, esto es, de sangre venosa, en dos tubos de 10 ml y se colocaron en posición vertical en botellas universales de vidrio a 37° C durante 1 hora. Se aspiró la fracción de plasma rica en

- leucocitos resultante y se la centrifugó a 200 veces la gravedad durante 15 minutos. Se separó y desechó el plasma exento de células. El fondo restante formado por células fue suspendido en una solución isotónica glacial de cloruro de amonio tamponada con Tris introduciéndola en varias veces con la pipeta y se la mantuvo durante 15 minutos a 4°C a fin de producir la lisis de cualesquiera eritrocitos que quedasen. Se adicionaron 3 ml de Medium 199 y se centrifugaron las células a 200 veces la fuerza de la gravedad durante 15 minutos. Se separó y desechó el flotante formado y se lavaron las células restantes dos veces con 10 ml de Medium 199 cada vez. Se hicieron partes alícuotas con una concentración de 1×10^7 células por mililitro con Medium 199 como diluyente.

15.

Ejemplo 3

Ensayo de inhibición de la adhesión leucocitaria

- Se pusieron partes alícuotas de 0,1 ml de suspensiones de leucocitos sanguíneos que contenían 1×10^7 células por mililitro en tubos de ensayo de vidrio de 10 ml, 16 x 150 mm. Se agregaron a dichos leucocitos 0,1 ml de extractos de preparaciones derivadas de células tumorales incoexas, ó 0,1 ml de extractos de melanomas malignos. Se usaron varias concentraciones de extractos tumorales hasta determinar la concentración óptima. Se adicionó Medium 199 para llevar el volumen final de la mezcla de leucocitos y células objeto de la prueba a 0,5 ml. A continuación se agitó la mezcla y se pusieron los tubos en posición horizontal de modo que el contenido de los tubos cubriese las tres cuartas partes de la superficie de cada tubo. Se incubaron luego los

tubos horizontales durante 2 horas a 37°C en una atmósfera humidificada de aire y 5% de CO₂. Durante el periodo de incubación no se perturbaron ni se movieron los tubos. Después de la incubación, se colocaron los tubos en posición vertical y se agitó el contenido de cada uno con una pipeta pasteur. Se contó el número de células por milímetro con un hemocitómetro. En la tabla siguiente se consignan los resultados expresados como índice de no adherencia (INA).

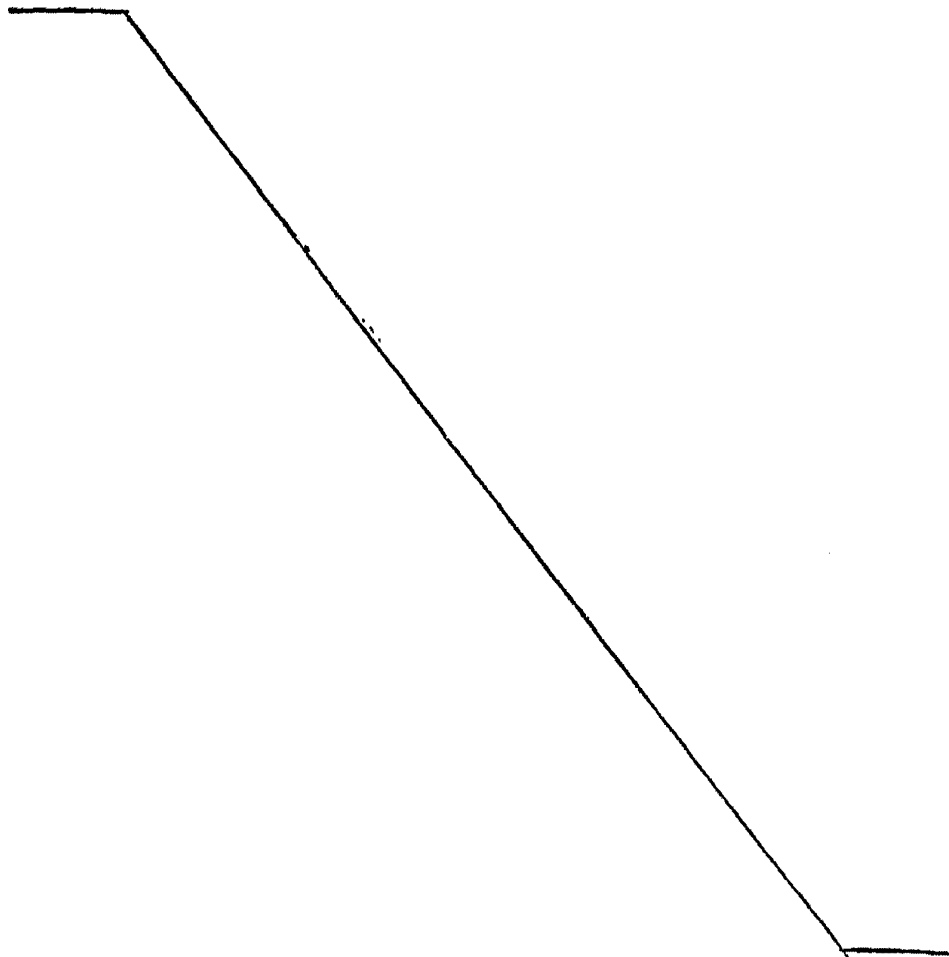


TABLA I

Inhibición de la adherencia de los leucocitos inducida por antígeno en tubos de vidrio por el extracto de melanoma maligno

Diagnóstico clínico	Porcentaje de células no adhesivas en presencia de			Índice de no-adherencia Melanoma ^a
	Antígeno de melanoma maligno	Antígeno de cancer de mama	Sin antígeno	
Melanoma	39%	22%	8%	77
Melanoma	46%	23%	5%	100
Melanoma	41%	21%	9%	95
Cáncer de mama	20%	29%	10%	NC
Cancer de mama	35%	60%	13%	NC
Cáncer intestinal	27%	28%	6%	-3
Cáncer de pulmón	32%	27%	9%	14
Cancer de ovario	39%	36%	18%	8
Cáncer de vejiga	31%	24%	13%	29
Colecistitis	24%	24%	9%	0
Hernia inguinal	17%	18%	2%	-6

^aÍndice de no adherencia (INA)

al melanoma maligno

= $\frac{\text{Número de células no adhesivas en presencia de extracto de melanoma}}{\text{Número de células no adhesivas en presencia de antígeno inconexo}}$

$\times 100$
Número de células no adhesivas en presencia de antígeno inconexo.

NC = no calculado.

- Los resultados que figuran en la Tabla I indican que los pacientes con melanomas malignos poseían un INA mayor que el de los otros pacientes cuando la dilución del extracto de melanoma era de 1:8. Los leucocitos de sangre periférica de los pacientes con melanomas malignos incubados con extracto de melanoma mostraron una no adherencia de leucocitos comprendida entre el 35 y el 65 %, mientras que las mismas células incubadas con extracto de cáncer de mama presentaron una no adherencia de leucocitos del 15-39%.
5. Los individuos de control tuvieron una no adherencia de leucocitos del 15-39% y las reacciones al melanoma maligno y a los extractos tumorales de control fueron idénticas. El INA de los individuos de control fue inferior a 30 y el INA de los enfermos de melanoma maligno excedió de 30.
10. Al objeto de averiguar las condiciones óptimas de ensayo, es decir, la inhibición específica máxima de la adherencia de leucocitos junto con el mínimo de inhibición no específica, se ensayaron los extractos de antígeno a diferentes concentraciones con leucocitos procedentes de individuos de control y luego con leucocitos de pacientes con melanomas malignos. Como muestra el Cuadro 2. el INA disminuye al aumentar la dilución. En este ejemplo, sin embargo, una dilución de 1/8 del extracto de cáncer de mama y del extracto de melanoma maligno dieron un alto porcentaje de no adherencia leucocitaria para el paciente con melanoma maligno y un pequeño porcentaje de no adherencia leucocitaria para el paciente con cáncer de mama. Por consiguiente, para la finalidad de este invento, es preferible una dilución de 1/8 del antígeno, es decir, una parte de extracto
- 15.
- 20.
- 25.

de antígeno por 8 partes de diluyente. Sin embargo, se obtienen buenos resultados con diluciones desde 1:4 hasta 1:6.

TABLA II

EFECTO DE LA DILUCION DEL ANTIGENO SOBRE LA INHIBICION DE LA ADHERENCIA LEUCOCITARIA

Diagnóstico	Dilución del antígeno	Porcentaje de no adherencia leucocitaria al extracto de melanoma
10. Calculosis biliar	1:4	42%
	1:6	37%
	1:8	30%
	1:16	20%
15. Hernia	1:4	38%
	1:6	35%
	1:8	28%
	1:16	21%
Cáncer de mama	1:4	39%
	1:6	36%
	1:8	29%
	1:16	25%
20. Melanoma maligno	1:4	47%
	1:6	47%
	1:8	46%
	1:16	39%

Los enfermos de calculosis biliar y de hernia sirvieron de controles, los pacientes con cáncer de mama proporcionaron el antígeno no específico y los pacientes con melanoma, el antígeno específico.

25. La Tabla III muestra que el INA era semejante al exponer los leucocitos de sangre periférica de pacientes con melanomas malignos a extractos de melanoma alogenos/autóctonos. El único paciente con una reactividad reducida al extracto de tumor autóctono padecía una melanoma maligno en fase avanzada y el INA de dicho paciente había disminuido en forma correspondiente.

TABLA III

Indice de no adherencia de leucocitos de pacientes
con melanomas malignos a cuatro diferentes extractos
de melanoma maligno

5.	Diagnóstico sobre el paciente	INA ^a al extracto de melanoma maligno procedente de			
		McK	LC	DC	IO
	Melanoma maligno McK	100	85	—	72
	Melanoma maligno LC	50	68	30	57
	Melanoma maligno DC	40	106	86	70
10.	Melanoma maligno IO	185	157	57	33
	Control	27	-15	-5	0

^aSe considera significativo un INA superior a 30.

15. Cuando se emplearon otros tumores como antígeno no específico de control los resultados obtenidos fueron semejantes a los de extracto de cáncer de mama como control no específico. Al efectuar un ensayo con extracto de cáncer de vejiga respecto de pacientes con melanoma malignos y cáncer de vejiga y un individuo de control, los leucocitos de los enfermos de melanoma reaccionaron al extracto de melanoma y los leucocitos de los enfermos de cáncer de vejiga reaccionaron al extracto de cáncer de vejiga. Ninguno de dichos leucocitos reaccionó al antígeno no específico o al control. Esto indica que el procedimiento del invento es aplicable tanto para detectar el cáncer de vejiga como para detectar el melanoma maligno. El cáncer de vejiga es un carcinoma. En la Tabla IV se resume lo expuesto.

20.

25.

TABLA IV

Inhibición de la adherencia leucocitaria en tubos de ensayo al melanoma maligno con extracto de cáncer de vejiga como antígeno no específico

5.	<u>Diagnóstico sobre los pacientes</u>	<u>Nº on- sayado</u>	<u>Nº posi- tivo</u>	<u>INA al melanoma^a promedio</u>	<u>amplitud</u>
	Melanoma maligno	6	6	85	41-133
	Cáncer de vejiga	15	0	-22	25-(-47) ^b
	Enfermedad benigna	4	0	9	0-15
10.	Otra enfermedad	2	0	16	14-18

^a INA calculado con melanoma como antígeno específico y cáncer de vejiga como antígeno no específico.

^b Los INA calculados con extracto de vejiga como antígeno específico y extractos de melanoma como antígeno no específico dieron por resultado que de 15 pacientes con cáncer de vejiga había 9 que tenían un INA mayor que 30 como reacción al extracto de cáncer de vejiga, un INA de 38 como promedio y una amplitud de variación de 90-(-20).

15.

Los leucocitos de dos melanomas malignos que eran reactivos a extracto maligno de melanoma no mostraron reactividad cruzada a extractos de tumores de pulmón, vejiga u ovario cuando se sometieron al ensayo de inhibición de la adherencia leucocitaria, conforme a este invento.

20.

En 33 pacientes con melanomas malignos confirmados histológicamente se produjo una inhibición de la adherencia leucocitaria con leucocitos de sangre periférica de 22 enfermos de melanoma maligno. En esta serie de pacientes y con estos extractos tumorales, se seleccionó un INA superior a 30 como pacientes con melanomas e individuos de

25.

control significativos. En la Tabla V siguiente es aparente que entre 475 individuos de control había 21 que tenían un INA superior a 30. Después de proceder a un nuevo ensayo solo dos individuos continuaron teniendo un INA superior a 30.

5.

No se produjo inhibición de la adhesión leucocitaria con los pacientes de control cuyos cánceres no eran melanomas malignos al ser examinados en cuanto a su reacción al extracto de melanoma. En los pacientes con melanoma malignos que fueron examinados mediante la prueba según el invento antes de proceder a la extirpación quirúrgica del melanoma se encontraron unos INA de 61, 103 y 32 como promedio para melanomas malignos en fase I, fase II y fase III, respectivamente. Este resultado difiere de modo estadísticamente significativo del grupo de control ($p < 0,001$ en pruebas no apareadas).

10.

15.

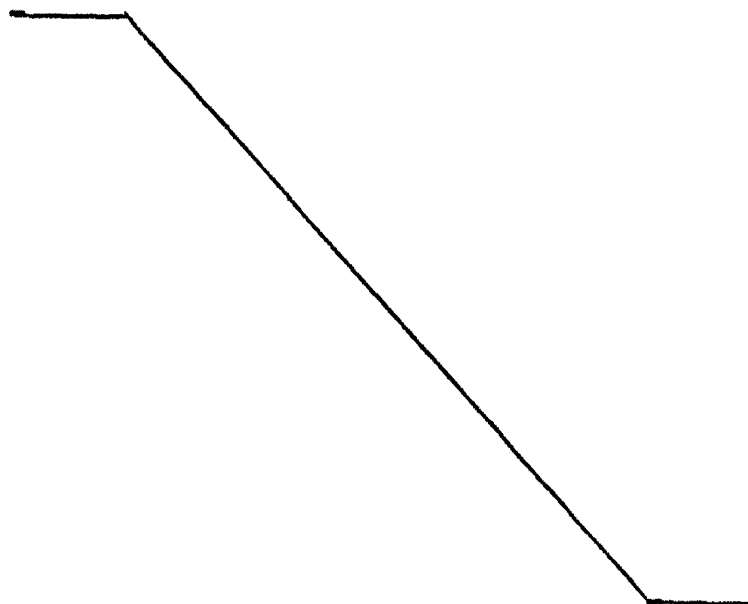


TABLA V

Resumen de pacientes objeto de pruebas sobre la inhibición de la adhesión leucocitaria en tubos de ensayo con respecto al extracto de melanoma

	<u>Pacientes examinados</u>	<u>Total</u>	<u>Positivo^a</u>	<u>INA Pro- medio</u>
5.	melanoma maligno			
	Fase I	13	11	61
	Fase II	7	7	103
10.	Fase III	5	2	32
	Exento de enfermedad 1 año	8	2	22
	Halo Nevus	1	1	31
	Individuos de control			
	Enfermedad benigna proquirúrgica	162	5	-2
15.	Enfermedad benigna de mama	119	4	
	Negros sanos de Antillas	8	0	5
	Cáncer inconexo			
	Cáncer de mama	153	10	-21
20.	" " pulmón	6	0	
	" " intestinos	5	1	
	" " vejiga	15	0	
	" " vejiga	15	0	-4
	" " ovario	5	0	
25.	" " tiroides	2	1	

^aSe consideró positivo un INA superior a 30

Fase I - un melanoma maligno primario localizado, confinado a la piel o al ojo

Fase II- metástasis de un nódulo linfático regional o repetición local de un tumor de la piel o de nódulos

linfáticos.

Fase III- metástasis distal.

- Según la fase del cáncer, los leucocitos de los pacientes con melanoma maligno presentaban grados de reactividad diferentes al ser sometidos al menosaje de inhibición de la adherencia leucocitaria. Entre los 13 pacientes con melanomas malignos localizados hubo 11 que presentaron reactividad al ser sometidos a dicho examen, aunque muchos de ellos tenían pequeñas lesiones cutáneas. Su INA promedio fue 61. El INA promedio de dos pacientes fue inferior a 30. Un paciente padecía de un melanoma maligno de 3 x 5 mm en la conjuntiva sin ninguna invasión y el otro paciente presentaba una lesión de 1 x 1 x 2 cm en la pierna. En todos los pacientes con melanomas malignos en fase II se halló reactividad al examinar la inhibición de la adhesión leucocitaria y su INA promedio fue de 103, el mayor que todas las fases.

- En cambio, entre los 5 pacientes con melanomas malignos en fase III hubo 3 que no presentaron reactividad al ser sometidos al examen de la inhibición de la adherencia leucocitaria. Además, el INA positivo de uno de los pacientes pasó a ser negativo cuando empeoró el tumor. Otro paciente en fase III que tenía un INA positivo fue operado para reseccionarle una metástasis solitaria del hígado y 16 meses después ha sido considerado clínicamente exento de cáncer. El INA promedio de 32 de los pacientes en fase III arrojó el valor más bajo entre los pacientes con cáncer activo.

Por último, 8 pacientes, todos los cuales habían

sido objeto de resecciones de melanomas malignos en fase I o II al menos un año antes y estaban clínicamente exentos de cáncer fueron sometidos a un examen de la inhibición de la adhesión leucocitaria en tubos de ensayo. En seis de los 8

5. pacientes se encontró un INA de 30 o menos y los dos pacientes restantes dieron un INA de 38 y 40. Estos pacientes en cuyo historial figuraba el melanoma maligno y que estaban clínicamente exentos de cáncer tenían un INA promedio de 22.

Fluido ascítico de un paciente con metástasis de

10. melanoma maligno en la cavidad abdominal fue sometido a un ensayo en que los leucocitos de un paciente con melanoma reactivo reaccionaron al fluido ascítico y al extracto del melanoma, indicando que el fluido ascítico contenía antígeno de melanoma.

Esta descripción muestra que el procedimiento según

15. el invento es un método sencillo y cuantificable para medir la inmunidad celular contra antígenos de melanoma maligno y antígenos de carcinomas de la vejiga, así como otros antígenos tumorales, por ejemplo, carcinomas o sarcomas de pulmón, corvix, ovario e hígado. El ensayo es específico y reproducible desde el punto de vista inmunológico y puede aplicarse

20. utilizando extractos de tumores alogénicos y autólogos.

= . =

REIVINDICACIONES

25. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud U.S.A. nº 690.454 del 27 de Mayo de 1976.

= 23 =

- 1.- Método para detectar la presencia de melanomas y carcinomas en el cuerpo humano, particularmente carcinoma de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer cervical o sarcoma en los humanos, caracterizado porque en su realización comprende incubar una cantidad
5. medida de leucocitos sanguíneos del paciente con extractos acuosos básicos de tumor del cáncer que ha de detectarse, y determinar luego el índice de no adherencia de los leucocitos en comparación a un control.
10. 2.- Método, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en su realización el extracto de tumor procedo de un tumor del paciente que se somete a prueba, o no está sometido a prueba.
15. 3.- Método, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque particularmente el extracto tumoral de melanoma maligno es un extracto acuoso con pH de 7,3.
20. 4.- Método para detectar la presencia de melanomas y carcinomas en el cuerpo humano.
- Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 23 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 26 de Mayo 1977

p.a.

J A I M E I S E R N
p. p.

mpc.

Firmado: JOSE F. NIETO

