



ESPAÑA

(18) ES (11) (21) (22)	NÚMERO 477013	(10) A1
	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

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

(30) PRIORIDADES: (31) NÚMERO P 28 02 277.7	(32) FECHA 19 enero 1978	(33) PAIS Alemania
---	---------------------------------	---------------------------

(37) FECHA DE PUBLICIDAD	(38) CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	(39) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(64)	TITULO DE LA INVENCION "Procedimiento para la producción de preparados inmunológicos anti blásticos"
------	---

(71)	SOLICITANTE (ES) Dr. Karl Heinz Jaeger
------	---

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	Sonnenhof, D-7841 Obereggenen, (Alemania)
---------------------------	---

(72)	INVENTOR (ES) Dr. Karl Heinz Jaeger y Prof. Dr. H. Limburg
------	---

(73)	TITULAR (ES)
------	--------------

(74)	REPRESENTANTE Carlos Fernández Candelas
------	--

La vida de seres monocelulares y pluricelulares, -
de organismos de constitución simple y organismos complica-
dos, así como también del hombre sólo es posible por la -
existencia de mecanismos protectores contra factores pertur-
5 badores exógenos tales como sustancias tóxicas inactivas,
microorganismos activados tales como virus y bacterias, ac-
ciones físicas tales como temperaturas extremadas, radiacio-
nes de onda larga y de onda corta tales como rayos X, de ra-
dio o cósmicos. Tales factores perturbadores pueden destruir
10 rápida e inmediatamente por ataque a estructuras celulares
sensibles; con frecuencia actúan indirectamente por cade-
nas causales de muchos eslabones, que conducen a la parali-
zación de síntesis necesarias para la vida o de procesos de
desintoxicación. En los últimos mecanismos casi siempre par-
15 ticipan de algún modo las proteínas La inocuización biológi-
ca de proteínas ajenas a las células o incompatibles por -
otras razones, discurre a través de un gran número de meca-
nismos de defensa, la mayor parte de las veces heredados, -
pero también adquiridos en la vida del individuo, cuyo recog-
20 nocimiento y aprovechamiento terapéutico, pero también pro-
filáctico es misión de la inmunología. La lucha, y la erra-
dicación parcialmente ya lograda, de enfermedades infeccio-
sas por sueros específicos, vacunas, anticuerpos específicos,
etc. discurre, en su principio, siempre por el modelo de -
25 reacción de antígeno-anticuerpo, siendo fijado el antígeno
indeseado por la proteína específica del anticuerpo - al
igual que siempre un cuerpo proteínico o un compuesto que -

contiene proteínas -, siendo inocuizado de este modo y siendo soltado y separado o segregado al complejo del interior de las células o de la membrana celular; en tal caso, el modo de la "segregación o separación" es todavía objeto de investigaciones.

Por lo tanto ya al comienzo de la moderna investigación inmunológica, a la vista de los numerosos casos paralelos de enfermedades infecciosas y enfermedades malignas, - resultó evidente producir también anticuerpos contra la combinación antígeno-proteína maligna, extraña a las células, del carcinoma, del sarcoma o de la leucemia, tal como lo intentó Paul Ehrlich, como fundador decisivo de la moderna investigación acerca de los tumores. Sorprendentemente, fracasó un tratamiento inmunológico activo o pasivo, a pesar de que posteriormente se encontraron indicaciones de que existen mecanismos enteramente inmunológicos contra el cáncer. Si, por ejemplo, por implantación de una sustancia cancerígena en un ratón se genera un carcinoma y éste se extirpa - en el momento oportuno, en este ratón ya no se presenta el mismo tumor, que mata a ratones no operados. También en el caso de un tumor maligno que existe en Africa, el denominado tumor de Burkitt, después de una terapia satisfactoria - con preparados quimio-terapéuticos se hallan en la sangre los anticuerpos curados, que pueden curar directamente, es decir sin quimioterapia a un paciente enfermo del tumor de Burkitt. Sin embargo, a pesar de la inmensa propagación de la investigación especializada en todo el mundo, todavía no

exista ningún tratamiento inmunoterápico del crecimiento maligno.

De acuerdo con la opinión general, un carcinoma resulta por modificación de células corporales normales; por lo tanto, un crecimiento maligno tiene como condición previa la presencia de tejido normal. Además es sabido que en el organismo sano resultan constantemente por determinadas influencias siempre células malignas, las cuales sin embargo permanecen bajo control de la porción circundante sana, son "degradadas" y no producen ningún tumor. Este aparece sólo cuando está presente un número determinado de células malignas, que según ensayos realizados con animales se encuentra entre 10^4 hasta 10^6 células. La transferencia de una célula cancerosa individual también a un organismo ya enfermo de cancer permanece sin consecuencias en el ambiente normal. Sin embargo aunque bajo estas condiciones previas en el mejor de los casos de manera inmunológica pueden resultar de aceleraciones de la enfermedad pero no ninguna curación, por otro lado se garantiza una curación espontánea de crecimientos malignos, parece permisible la idea de poner en duda la validez general de las condiciones mencionadas y consultar sobre otras posibilidades de explicación y de ensayo. ¿Son por lo tanto las células benignas y las células malignas tan fundamentalmente diferentes de las normales como se suponía hasta ahora?. ¿Es la formación de una célula maligna necesariamente una consecuencia de una influencia en la formación o el desarrollo de esta célula o más bien es una perturbación

de la degradación de la célula?. Es sabido que un número demasiado elevado de células cancerosas grava en exceso las posibilidades inmunológicas del organismo. ¿fracasan por lo tanto en la formación del cáncer clínico los mecanismos de degradación normales, por ejemplo la degradación enzimática de la proteína celular cancerosa modificada, que es tratada por lo demás al igual que la proteína corporal, pero entonces se pone a disposición de antígenos en otros lugares de rotura para la degradación, y por consiguiente presta ayuda a la propagación del tumor?. Dado que hasta ahora no existe ningún diagnóstico precoz del carcinoma, una intervención terapéutica, incluso inmunológica, sólo es posible cuando se ha manifestado el tumor. Sin embargo la relación de células malignas a células normales no se puede modificar en un organismo intacto; la operación, la irradiación o la quimioterapia lo intenten, la operación en el caso de diagnóstico precoz con éxito convincente: la irradiación está gravada con efectos secundarios, que pueden superar a su efecto reductor o rebajador de células tumorales, que entonces también prosigue a través del proceso de degradación inmunológico, y por consiguiente a fin de cuentas la pueden hacer ineficaz; la problemática de la quimioterapia es la aparición de efectos secundarios, que impiden su prosecución y por consiguiente limitan su actividad. De ello se induce la pregunta de por qué no podría realizarse "in vitro" la mejora de la relación de células malignas a células normales fuera del organismo y aportar terapéuticamente los productos de degradación -

intermedia normales como auxiliar inmunológico.

Las modernas enseñanzas de la generación de la vida establece que en el caldo original resultaron sustancias complicadas prebioticamente tales como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas y compuestos hormonales, a partir de los cuales se desarrollaron en etapas individuales seres monocelulares, que se defendieron satisfactoriamente contra las duras condiciones ambientales tales como irradiación masiva con ultravioletas, irradiación cósmica, altas diferencias osmóticas, altas temperaturas, etc. Las condiciones de generación las denominaríamos hoy día, sin más consideraciones, favorecedoras del cáncer, cuando no carcinógenas. Sin embargo, estas células no eran ni benignas ni malignas, dado que tal atributo carece de sentido para células individuales. Eran vividas y se desarrollaban para formar seres pluricelulares, que eran normales y poseían todos los mecanismos de regulación, que aseguraban su normalidad. El recuerdo de la vida monocelular primitiva fue transferido genéticamente; sin embargo, puede ocurrir siempre evidentemente un retroceso a los antiguos hábitos de metabolismo, con tanta mayor facilidad cuanto que al aumentar la edad los mecanismos de regulación filogenéticamente más jóvenes se van haciendo más débiles, y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas y por consiguiente la síntesis de fermentos también a partir de los péptidos, peptonas, aminoácidos, etc. que resultan en la degradación celular y que se pueden utilizar de nuevo, por lo que a partir de un número suficiente de cé-

lulas individuales filogenética e individualmente sanas se puede formar un tumor maligno.

Por consiguiente se trata de asegurar predominantemente la degradación celular normal y proporcionar matrices para la formación de anticuerpos, que sean capaces de controlar los antígenos internos de las células. A las posibilidades normales de proporcionar las matrices correctas pertenecen radiaciones inherentes al cuerpo, que resultan en muchos procesos de metabolismo, tales como las radiaciones mitogénicas o también radiaciones dañinas procedentes de la sangre, que son capaces de dañar gravemente y destruir a los fibroblastos normales (Jaeger 1930), un proceso que puede ser decelerado mediante lavado de los cultivos celulares y puede ser transmitido a otros cultivos normales mediante las aguas de lavado.

En el intento de asegurar mediante agentes quimioterapéuticos el tratamiento clínico de carcinomas, Limburg y Krahe ensayaron en 1964 los diferentes tipos de agentes citostáticos, tales como sustancias alcoholilantes, antimetabolitos y venenos de mitosis o cariocinesis, en cuanto a su diferente sensibilidad frente al tejido canceroso humano en un cultivo de tejidos, y encontraron considerables diferencias, que hicieron posible desarrollar para la pertinente paciente hembra una terapia óptima con agentes citostáticos. Entonces se pudo comprobar con sorpresa que los signos citológicos, generados "in vitro" por los agentes citostáticos, del deterioro hasta la muerte celular coincidían con los -

provocados por la "irradiación de la sangre" (1930) en numerosos detalles, tal como lo pone de manifiesto convincentemente una comparación de las fotografías o reproducciones originales.

5 De este descubrimiento se obtuvo la conclusión de que la degradación de células cancerosas, independientemente del noxa o agente nocivo que induce la degradación, sigue un mecanismo variable sólo dentro de estrechos límites de cuadro fijamente establecido. La fácil accesibilidad de las
10 matrices de degradación y los grados de deterioro de diferente gravedad unos con respecto a los otros en los cultivos de células cancerosas condujo por consiguiente al intento de ensayar este material directamente en cuanto a su efecto inmunógeno frente a células cancerosas. Con el fin de -
15 acortar el largo tiempo de investigación con muchos tumores de animales, los inventores utilizaron in vitro células L (capa 929 de fibroblastos de ratón monocapa [metodología, véase Riede y otros 19757]), células cultivadas hace aproximadamente 30 años, que se habían desarrollado a partir de una única
20 célula de un fibrosarcoma de ratón, es decir que eran totalmente idénticas desde el punto de vista genético; en el caso de reimplantación en un ratón sano desarrollaron éstas inmediatamente de nuevo el tumor inicial con gran malignidad. La dispersión del método es inferior a 1%, por lo que
25 la experimentación in vitro puede ser equiparada en la práctica al efecto in vitro. El desarraigo de las células al final del ensayo (168 horas) y la coloración de acuerdo con

Feulgen permiten determinar el momento de ataque exacto - del correspondiente agente en la célula así como el momento en el ciclo celular.

5 En las investigaciones, realizadas durante años - por los inventores, del efecto citostático sobre el tejido canceroso humano in vitro no se observó ningún caso, en el cual uno no se tropezase con sensibilidades a la mayor parte de las veces varios citostáticos, pero incluso con frecuencia muy diferentes citostáticos.

10 Se ha encontrado ahora que la incorporación en - una sola vez de células cancerosas humanas, que habían estado bajo la acción de agentes citostáticos, en una cantidad normalizada de 10^6 células y/o del medio de cultivo utilizado para su desarrollo, condujo a inhibiciones del crecimiento de las células L hasta en un 85% de todas las células; con una administración en dos veces se habrían de destruir todas las células L. La mayor parte de las veces se -
15 trataba de acciones o efectos en el sentido de un bloque en la fase G_1 o en la fase G_2 , siendo plenamente reproducibles los resultados alcanzados. Se manifestó de manera totalmente inesperada y sorprendente el elevado efecto citostático de células cancerosas de mama humanas, que según el método de los inventores habían sido cultivadas y desarrolladas de modo totalmente igual, sin adición de ningún tipo de agente
20 citostático. Además de la del cancer de mama los inventores encontraron este comportamiento sorprendente también en carcinomas oviales, aunque más raros en cuanto a su número.

El significado de estos descubrimientos permite -
obtener la conclusión de que algunos carcinomas todavía son
poseedores de factores reguladores, que pueden ser detecta-
dos in vitro y que son capaces de destruir a células cancero-
sas ajenas. Por consiguiente se ha logrado, a partir de célu-
5 las cancerosas cultivadas "in vitro" y susceptibles de con-
tinuar siendo cultivadas a deseo, cuya sensibilidad frente
a determinados agentes citostáticos había sido ensayada pre-
viamente, y a partir de células cancerosas originariamente
10 antígenas, producir un preparado inmunológico, que mediante
mezclado de las diferentes actividades contenga todas las -
matrices que aseguran inmunológicamente la degradación de
células cancerosas. Este preparado puede ser utilizado por
sí solo o en combinación con otras medidas anticarcinoma-
15 sas. La compatibilidad es óptima, dado que se trata cierta-
mente de células humanas en número pequeño, comparable apro-
ximadamente a la inyección i.m. de 1 mililitro de sangre.
Una combinación del preparado con agentes mitógenos o coad-
yuvantes, tales como por ejemplo un extracto sanguíneo de ba-
20 jo peso molecular, procedente de la sangre de terneros jóve-
nes puede actuar aumentando la inmunidad mediante adición -
previa o simultánea a una o a todas la células utilizadas. Las
células utilizadas para el preparado de acuerdo con el inven-
to, tras alcanzarse la degradación deseada, pueden también
25 ser congeladas a muy baja temperatura in vitro y pueden ser
almacenadas a -80°C para la producción del preparado termina-
do para el uso o la administración. Estos, en las mezclas -

deseadas, o bien son descongelados antes de la utilización o bien son liofilizados en la mezcla terminada.

La concentración final de la mezcla a base de por lo menos tres cepas celulares sensibles diferentes y una cepa celular espontáneamente activa se encuentra en 10^6 células, pero puede ser aumentada hasta 10^8 células.

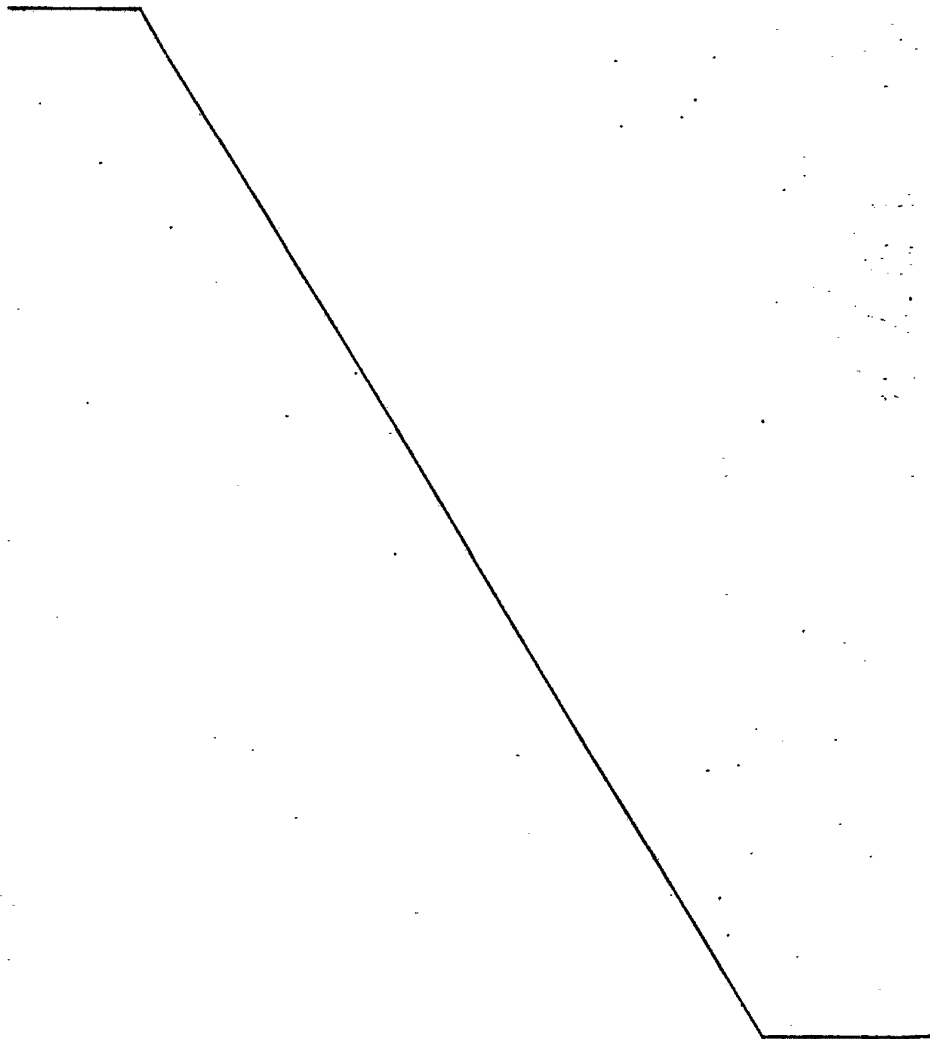
EJEMPLO

Inmediatamente después de la operación se extraen de modo estéril pequeños trocitos de cáncer situados lo más alajados posible de eventuales necrosis, se lavan en solución tampón de fosfato, al que se han añadido antibióticos en cantidad usual, se someten a tripsinación, y de acuerdo con el método de Limburg se ensayan en cuanto a sensibilidad frente a los agentes citostáticos habituales. Las células no necesarias para el ensayo son recogidas de modo estéril a aproximadamente 4°C , hasta que se tenga presente el resultado de ensayo, luego se añaden citostáticos adecuados, se incuba durante 48-72 horas, se ajusta a un número de células de 10^6 por ml, y o bien se conserva a -80°C o bien se reúne con otros dos tipos de células de otra sensibilidad frente a agentes citostáticos, talés como un tumor canceroso de mama con destrucción espontánea de las células L, en la proporción 1:4, se funde de modo estéril en ampollas de 1 ml, o se liofiliza en la relación mencionada.

La congelación intermedia a muy bajas temperaturas se suprime cuando se presenta suficiente material celular para la terminación del preparado final. El preparado puede

ser producido también a partir de cepas permanentes cultivadas de modo continuo, tales como HeLa y otras; pero entonces, de tiempo en tiempo, ha de comprobarse la actividad antigénica según el modelo de células L.

- 5 En el caso de leucemias han de separarse las células leucémicas y envasarse en una concentración de 10^9 por ml después del ensayo; sin embargo, en este caso se añade siempre un agente mitógeno durante 24 horas y se envasa conjuntamente.



- REIVINDICACIONES -

1.- Procedimiento para la producción de preparados inmunológicos antitumorales, a partir de células tumorales humanas cultivadas in vitro, cuya sensibilidad frente a diferentes agentes citostáticos ha sido comprobada y cuyo efecto destructor sobre células L de cepa 929 ha sido detectado, caracterizado porque se utilizan por lo menos tres tumores diferentemente sensibles, que actúan en etapas del ciclo celular de manera comprobadamente diferentes.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque una de estas tres cepas constituye un material canceroso de mama espontáneamente tóxico para células L.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración final por ml es de 10^6 hasta 10^8 células.

20 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se separan células leucémicas de la sangre restante, se incuban durante 24 horas con un agente mitógeno, preferiblemente con un extracto de sangre de ternero, y sólo entonces se ensayan con los agentes citostáticos y se liofilizan, con una concentración final de 10^9 células.

25 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células cancerosas diferentemente sensibles y el preparado terminado son compuestos a partir de las cepas enfriadas a muy baja temperatura.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca-

racterizado porque las células son separadas del líquido de cultivo y transformadas en dos productos finales diferentes.

7.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE PREPARADOS INMUNOLOGICOS ANTIBLASTICOS".

5 Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 ENE. 1979

CARLOS FERNANDEZ CANDELA

