

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 205**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/48**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2007 PCT/SE2007/050878**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.0008 WO08063129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2007 E 07835461 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2094278**

54 Título: **Uso de partículas que contengan lípidos que comprenden saponinas quillaja para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**20.11.2006 US 866445 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.08.2017**

73 Titular/es:

**DUECOM (100.0%)  
Härkebergaby 6  
74596 Enköping, SE**

72 Inventor/es:

**HU, KEFEI y  
MOREIN, BROR**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 630 205 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## Uso de partículas que contengan lípidos que comprenden saponinas quillaja para el tratamiento del cáncer

### Descripción

[0001] La presente invención se refiere al uso de unas partículas que contienen lípido que comprende al menos un lípido y al menos una saponina, tales como liposomas, iscom y/o matriz de iscom y posintros para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento del cáncer. Las partículas son también sistemas de suministro para uno o varios compuestos para el tratamiento del cáncer con mecanismos complementarios.

[0002] Se refiere también a un método para el tratamiento del cáncer en el que una partícula de lípido que contiene que comprende al menos en lípidos y al menos una saponina se administra a un individuo en necesidad de tratamiento del cáncer.

[0003] Además, las invenciones se refieren a un kit de partes que comprende al menos dos partes, en el que una parte comprende partículas que contienen lípido que comprenden al menos una fracción de saponina, que es hidrófobo que tiene un efecto letal sobre las células cancerosas; y la otra parte comprende partículas que contienen lípidos que tienen al menos una fracción de saponina que es comparativamente hidrófila, estimulando y modulando la respuesta inmune tal como la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células.

[0004] La presente invención se refiere al descubrimiento de que componentes de *Quillaja* seleccionados en las formulaciones de partículas matan e inhiben el crecimiento de las células tumorales (en lo sucesivo llamadas KGI). Se prefieren las formulaciones particuladas porque son altamente biodisponibles. Pueden formularse con moléculas de orientación y pueden formularse para que sean bien aceptadas por el hombre o el animal sin efectos secundarios causados por el efecto lítico de las formas libres.

### La técnica anterior.

[0005] Las partículas que comprenden lípidos tales como liposomas y iscoms se han descrito como portadores de antígenos y adyuvantes.

[0006] Las propiedades inmunes estimuladores de saponinas de *Quillaja* se conocen desde hace mucho tiempo (Ramon 1926) y de saponinas de *Quillaja* se han utilizado en forma libre, a veces en combinación con  $\text{Al}(\text{OH})_3$  en las vacunas comerciales desde 1950:s (Dalsgaard 1978), Ma et al. (Ma, Bulger et al., 1994), (Espinete 1951). Un uso sustancialmente más eficiente de las saponinas de *Quillaja* en comparación con las formas libres convencionales se describió por Morein et al. (Morein, Sundquist et al., 1984)- la tecnología ISCOM (EP 0 109 942 B1, EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 564 B1) y algunos años más tarde la tecnología de matriz ISCOM (Lovgren y Morein 1988) EP 0 436 620 B1). Utilizando la tecnología iscom, los antígenos vacunales se incorporan en un complejo de 40 nm que consiste en saponinas de *Quillaja*, colesterol y fosfolípidos.

[0007] Se conoce a través de US 2005/017623A1 que saponinas de *Quillaja* presentan actividad anticancerosa. Sin embargo, las saponinas en forma bruta o fraccionada como tales tienen efectos secundarios generales debido a los efectos hidrófobocíticos que causan atrapamiento parcial en el sitio de administración. Por lo tanto, las formas libres de saponinas no son realistas en el tratamiento del cáncer. En consecuencia, las saponinas como tales no se han convertido en fármacos contra el cáncer útiles.

[0008] Además, la tecnología de iscom se ha desarrollado en una vacuna contra el cáncer que comprende antígenos del cáncer integrados en el complejo de iscom. Sin embargo, mientras que los antígenos en estas vacunas provocan respuestas de anticuerpos (y mediadas por células), el complejo iscom como tal se degrada y no estará presente si el individuo se ve afectado con células cancerosas en el futuro.

[0009] Ahora se ha puesto de manifiesto que los lípidos que contienen partículas que comprende al menos un lípido y al menos una saponina y tales iscoms y matrices de iscom se pueden usar para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento del cáncer.

[0010] Las células cancerosas son de 30 a 40 veces más sensibles que las células normales al lípido y saponina que comprenden partículas según la invención. Las partículas que contienen lípidos y saponinas inducen apoptosis que mata las células cancerosas.

[0011] El efecto letal se debe a un prominente inductor de la apoptosis. Alta concentración induce la apoptosis más temprana. Después del tratamiento con las partículas que contienen lípidos de acuerdo con la invención, las células no permanecen en el ciclo celular, es decir, no pasan a un segundo ciclo. Por lo tanto, la muerte de las células cancerosas es irreversible. La fase de producción se ilustra por el hecho de que la producción de IL-8 sigue por apoptosis.

[0012] Después de un cultivo prolongado de células cancerosas, las células no vuelven a reproducirse después del tratamiento, más significativamente, incluso después de la exposición a una dosis fisiológica baja interrumpida.

[0013] La muerte de células cancerosas ha sido analizada por varios métodos, incluyendo tinción con azul tripán, inhibición metabólica enzimática por el método de azul alamar, por cambios necróticos visualizados por tinción con yoduro de propidio y por apoptosis a través de tinción de anexina V como se describe en Materiales y Métodos.

[0014] Caroline Skene y P. Sultone, " Saponin adjuvanted vaccines for clinical use" Methods: A companion to methods in enzymology, Academic press Inc., Nueva York, NY, Estados Unidos, vol. 1, nº 1, 1 de septiembre de 2006 (2006-09-01), páginas 53-59 es un artículo de revisión. La revisión revela formulaciones adyuvantes basadas en productos de saponina y está limitada al aspecto de adyuvante en relación con antígenos vacunales coadministrados y ningún tratamiento de cáncer se revela en el artículo.

### **Resumen de la invención.**

[0015] La presente invención se refiere al uso de un partículas que contienen lípido que comprende al menos un lípido y al menos una saponina, tales como liposomas, iscom y/o matriz de iscom y posintros para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento del cáncer.

[0016] Se refiere también a un método para el tratamiento del cáncer en el que un lípido que contiene una partícula que comprende al menos un lípido y al menos una saponina se administra a un individuo en necesidad de tratamiento del cáncer.

[0017] Además, la invención se refiere a un kit de partes que comprende al menos dos partes, en las que una parte comprende partículas que contienen lípido que comprenden al menos una fracción de saponina, que es hidrófobo que tiene un efecto letal sobre las células cancerosas; y la otra parte comprende partículas que contienen lípidos que tienen al menos una fracción de saponina que es hidrófila, estimula y modula la respuesta inmune tal como la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células.

[0018] La presente invención se refiere al descubrimiento de que selecciona saponinas tales como componentes de *Quillaja* en lípidos en partículas que contienen formulaciones que poseen efectos de inhibición de eliminación y crecimiento sobre las células tumorales (en lo sucesivo denominados KGI y BBE). La saponina o fracciones de saponina se seleccionan por su capacidad para matar o inhibir el crecimiento de células tumorales. La formulación de partículas se selecciona debido a su alta biodisponibilidad y que las partículas pueden formularse para que sean bien aceptadas sin efectos secundarios por los individuos, por ejemplo, el hombre o el animal, en comparación con formas libres de saponinas brutas o formas libres de saponinas.

[0019] Otras saponinas o fracciones de saponina (incluyendo QHA de fracción de *Quillaja* Saponaria Molina) pueden seleccionarse, ya que pueden o no exhibir tal efecto KGI, pero que exhiben efectos neutralizantes, de bloqueo y de equilibrio potentes sobre el KGI. Estas fracciones pueden también en forma de partículas como parte de la partícula de KGI o en una partícula de BBE separada matar algunas células cancerosas en sinergia con partículas o no partículas de QHC. El efecto de bloqueo y equilibrio es, en adelante, contratado a BBE. Las partículas de KGI y BBE estimulan y modulan las respuestas de protección inmune a los antígenos tumorales liberados de las células tratadas con las partículas de KGI y muertas, que por presentación cruzada pueden presentar antígenos, o por el hecho de que la BBE puede estimular directamente las células presentadoras de antígeno (APC) a efectos antitumorales.

[0020] La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes figuras de las que:

### **Leyendas de figuras**

[0021]

Fig. 1,1. La estructura triterpenoide de la saponina de *Quillaja*,

Fig. 1,2. El perfil de fase inversa de la saponina de *Quillaja*. La fracción C es el componente principal y activo de KGI 1 y la fracción A es el componente principal y activo de BBE.

Fig. 1,3. Imagen microscópica de electrones de KGI 1

Fig. 2.1. Las diferencias estructurales entre QHC y QHA. El efecto altamente lítico de QHC para las membranas celulares está relacionado con la cadena de acilo grasa a la derecha del punto marcado 3. La QHA carece de la cadena de acilo grasa haciéndola mucho más hidrófila y consecuentemente menos lítica. Tanto QHC como QHA son naturalmente componentes de la saponina de *Quillaja* no fraccionada (véase el patrón de separación por

HPLC en la Fig. 1,2).

Fig. 3.1. KGI 1 mata la célula cancerosa U937 a una concentración baja medida por el método de AlamarBlue.

5 Fig. 3.2. Se requiere una dosis alta de KGI 1 para matar células dendríticas humanas normales (DC)

Fig. 4.1. BBE no es tóxico para las células tumorales U937

Fig. 4.2. BBE no es tóxico para las células dendríticas humanas normales (DC)

10 Fig. 5.1. En la relación de 10 a 1 entre BBE y KGI 1, BBE bloquea el efecto letal por KGI 1. Se llevó a cabo esta prueba con una concentración fija de KGI 1 es decir, 77 µg/ml y concentraciones crecientes de BBE como se muestra en el eje X.

15 Fig. 6.1. KGI 2 tiene dos componentes de saponina (QHA y QHC en varias proporciones, es decir, 9,5: 0,5; 7,5: 2,5 y 7,0: 3,0) en una misma partícula. La capacidad de muerte de cáncer de KGI 2 en células U937 se aumenta con la proporción creciente de QHC.

20 Fig. 6.2. KGI 2, que tiene dos componentes de saponina (QHA y QHC) en una relación de 7: 3 en una misma partícula, requiere una concentración más alta de la sustancia activa QHC que KGI 1 (véase Fig. 3.1 en el ejemplo 3) para matar el Células cancerosas U937.

25 Fig. 6.3. KGI 2, que tiene dos componentes de saponina (QHA y QHC) en una proporción de 7: 3 en una misma partícula, requiere una concentración más alta de sustancias activas QHC que KGI 1 (véase Fig. 3.2 en el ejemplo 3) para matar DCs humanos normales que para matar las células cancerosas U937.

Fig. 6.4. Varias formulaciones KGI y BBE activan los CD inmaduros derivados de monocitos para madurar y expresar un marcador DC CD86 que es una molécula de DC activadas que se comunican con linfocitos a la diferenciación y activación para ser células efectoras.

30 Fig. 7.1. Las partículas de KGI 1 inhiben la replicación de las células cancerosas U937. Las células se sembraron en placas de microtítulo, a partir de entonces se expusieron a 2 µg/ml (M2) KGI 1 durante el período de cultivo experimental de 9 días y se contó el número de células viables a diario por microscopía después de la tinción con el azul de tripano.

35 Fig. 7.2. Partículas de KGI 1 inhiben la replicación de las células cancerosas U937 incluso después de la interrupción de la exposición a KGI 1. Las células se cultivaron y se expusieron durante 9 días con 2 µg/ml (M2) a KGI 1 como se describe en la Fig. 7.1. El KGI 1 se retiró después de 3 días de incubación. En los puntos temporales indicados por la flecha, se sustituyó el medio de cultivo. Las células de control se cultivaron sin KGI 1.

40 Fig. 7.3. Células cancerosas U937 cultivadas como se describe en la Fig. 7.1., se expusieron a una dosis alta de 25 µg/ml de la forma libre de KGI, es decir, fracción de QHC de Quill A (F) o a 25 µg/ml de KGI 1 como partículas (M) y se tomaron muestras como se indica en la figura. Las células se tiñeron con azul Tripán (véase Materiales y Métodos). La viabilidad celular se expresa como porcentaje de las células de control viables. A esta alta dosis, la forma libre de KGI 1 es decir la fracción QHC de Quill A mató las células rápidamente, es decir, dentro de las 3 horas, mientras que la partícula KGI 1 requirió un tiempo más largo, es decir, 24 horas para matar una proporción elevada de las células cancerosas.

50 Fig. 7.4. Células cancerosas de U937 fueron expuestas a la dosis fisiológica bajo de 2 µg/ml de la forma libre de KGI fracción 1 es decir QHC de Quill A (F) o a 2 µg/ml de KGI 1 (M) como de partículas como se indica en la figura. Las células se tiñeron con azul Tripán (véase Materiales y Métodos). La viabilidad se expresa como porcentaje de las células de control viables. A esta dosis baja, la forma libre de KGI 1 es decir la fracción QHC de Quill A no mató las células dentro de las 60 horas del cultivo, mientras que la partícula KGI 1 empezó a matar las células cancerosas después de 24 horas.

55 Fig. 7.5. Dosis muy bajas de partículas KGI 1 inhiben el crecimiento de células cancerosas U937. Las células se expusieron durante 12 días a las dosis bajas de 0,5 µg/ml (M0,5) o a 2 µg/ml (M2) de KGI 1 como se indica en la figura. El número de células se contó después de la tinción por el método de azul tripán (véase Materiales y Métodos). La baja dosis de 0,5 µg/ml de KGI redujo el número de células en comparación con las células no tratadas, mientras que la dosis de 2 µg/ml de Partícula de KGI 1 mató a todas las células cancerosas dentro de los 12 días de cultivo.

60 Fig. 7.6. KGI 1 induce la apoptosis en células cancerosas U937. Las células fueron expuestas durante 120 horas a KGI 1 a las concentraciones de 2 µg/ml (M2) o a 25 µg/ml (M25) en el medio de cultivo. El número de células positivas de anexina V se determinó mediante FACS (véase Materiales y Métodos). La concentración 2µg/ml provocó un aumento de la población de células apoptóticas con un nivel de pico después de 24 horas de

exposición. La concentración más alta, es decir, 25 µg/ml KGI 1 aumentó aún más la proporción de células apoptóticas con niveles pico después de la exposición durante 12 y 24 horas.

Fig. 7.7. KGI 1 no provoca un mayor número de células necróticas de cáncer U937. Las células fueron expuestas a KGI 1 por un período de 120 horas a concentraciones de 2 µg/ml (M2) hasta 50 µg/ml (M50) en el medio de cultivo como aparece en la figura. Las células fueron cultivadas y muestreadas como se describe en la figura 7.1 teñidas con yoduro de propidio y el número de células necróticas se determinó mediante FACS (véase Materiales y Métodos). No hubo diferencias en la proporción de células necróticas entre células tratadas con diversas dosis de KGI 1 o células de control no expuestas a KGI 1.

Fig. 7.8. KGI 1 provoca a lo largo del tiempo que las células cancerosas U937 se tiñan tanto por anexina V (apoptosis) como por yoduro de propidio (necrosis). Las células se cultivaron como se describe en la figura 7.1 y se expusieron durante 120 horas a KGI 1 a las concentraciones de 2 µg/ml (M2) hasta 50 µg/ml (M50) en el medio de cultivo. Las células se muestrearon y se tiñeron con yoduro de propidio y Anexina V como se indica en la figura. Las proporciones de células afectadas fueron determinadas por FACS. Las concentraciones crecientes indujeron un aumento de la población de células teñidas para efectos necróticos y apoptóticos.

Fig. 8.1. KGI 1 inhibe la proliferación de la célula cancerosa U937 y las células no vuelven a la proliferación cuando se siguen durante un período de cultivo de 12 días. Las células fueron expuestas a 0,5 µg/ml, (M0,5) y 2 µg/ml (M2) de KGI 1 en el cultivo hasta 12 días y las muestras se recogieron como se indica en la figura. Un punto de inflexión hacia el crecimiento celular reducido se observa después de la exposición de las células a KGI 1 durante 1 a 3 días. Las células viables se contaron después de tinción con azul Tripán.

Fig. 8.2. KGI 1 inhibe la proliferación de la célula cancerosa U937 y las células no vuelven a la proliferación después de la eliminación de KGI 1. Las células se privaron primero durante 22 horas para sincronizar las células en el ciclo celular (véase el texto). A continuación, las células se expusieron a 2 µg/ml de KGI 1 en el cultivo hasta 12 días y las muestras se recogieron y el medio se cambió cada tercer día. Se retiró KGI 1 de las células en el día 3. Las células viables se contaron después de tinción con azul Tripán.

Fig. 9.1. Ilustración del ciclo celular. La actividad de cinasa de timidina (TK) precede a la fase S, es decir, la fase de replicación del ADN. El efecto inhibitor de KGI 1 sobre el crecimiento celular parece tener lugar tarde en el ciclo de crecimiento celular al menos en dosis bajas.

Fig. 9.2. La actividad TK se midió en lisado celular diariamente después del tratamiento de 10<sup>6</sup>/ml de células cancerosas U937 con 2 µg/ml (M2) o 25 µg/ml (M25) de KGI 1 durante 5 días. El medio de cultivo celular no cambió durante este período experimental que explicaba la disminución de la actividad de las células no tratadas. La reducción de la actividad de TK de las células tratadas se comparó con la de los controles no tratados durante los 5 días de cultivo. La reducción de la actividad TK después de la dosis alta de 25 µg/ml de KGI 1 es prominente después de la exposición durante 24 horas y para la dosis baja de 2 µg/ml de KGI 1 después de dos días.

Fig. 9.3. La actividad TK se midió en lisado celular después del tratamiento de 10<sup>6</sup>/ml de células cancerosas U937 con 2 µg/ml (M2) o 25 µg/ml (M25) de KGI 1 durante un período de 5 días. La actividad de los TK se expresa como porcentaje de la de las células no tratadas (véase también la Fig. 9.2).

Fig. 9.4. La actividad TK se midió en lisado de células al día durante 120 horas después del tratamiento de 10<sup>6</sup>/ml de células cancerosas U937 con partículas KGI 1 en concentraciones de 2 µg/ml (M2), 10 µg/ml (M10), 25 µg/ml (M25) 50 µg/ml (M50). La reducción de la actividad de los TK después del tratamiento con KGI 1 en partículas se comparó con la del KGI 1 libre, es decir, no particulado, ensayado en las mismas concentraciones designadas con F. A bajas dosis fisiológicas, la reducción se hizo prominente después de la exposición de las células durante 48 horas (M2), pero menos prominente para KGI 1 libre (F<sub>2</sub>). La reducción de la actividad TK después del tratamiento con la dosis alta de concentración de 25 µg/ml o superior de KGI 1 es prominente después de la exposición durante 24 horas. Las células tratadas con las dosis altas de KGI libre, es decir 25 µg/ml y 50 µg/ml de fluido de cultivo de células no mostraron actividad TK detectable (véase también la Fig. 9.5).

Fig. 9.5. La actividad TK se midió en medio de cultivo celular diariamente después del tratamiento de 10<sup>6</sup>/ml de células cancerosas U937 con partículas KGI 1 en concentraciones de 2 µg/ml (M2), 10 µg/ml (M10), 25 µg/ml (M25) 50 µg/ml (M50) durante 5 días. Actividad TK no se detectó en el medio de las células tratadas con partículas KGI 1. Las células tratadas con el libre, es decir no en partículas KGI 1 a prueba en las concentraciones de 25 µg/ml, y 50 µg/ml designada con F; TK liberado al fluido del cultivo (véase también la Fig. 9.4). La actividad exclusiva de TK en el medio de cultivo celular, pero no en las células, indica fugas y daño a la membrana celular.

Fig. 9.6. La actividad de quinasas de timidina (TK) se analizó en las células cancerosas U937 después de la inanición celular durante 22 horas (véase texto) para sincronizar las células en el ciclo celular. A continuación, las células se expusieron a 2 µg/ml de KGI 1 para 0, 2, 8, 18 y 24 horas. Los controles no tratados se muestrearon a

0, 8 y 24 horas (véase el texto). KGI 1 (2 µg/ml es decir, M2) reduce la actividad de quinasa de timidina de las células cancerosas U937 registradas en muestras de células tratadas durante 18 y 24 horas. Los resultados indican que no hubo inhibición de la actividad de TK con la dosis baja durante las primeras 8 horas, sino después de 18 horas.

Fig. 9.7. KGI 1 (2 µg/ml) inhibe la proliferación de la célula cancerosa U937 detectada después de 18 horas de exposición. Primero, las células se privaron de alimento durante 22 horas para sincronizar la célula en el ciclo (véase el texto). El crecimiento celular reducido después de 18 horas de tratamiento coincide con la actividad reducida de TK como se muestra en la Fig. 9.6. Las células viables se contaron después de tinción con azul Tripán.

Fig. 9.8. La inhibición metabólica celular (azul Alamar) y la muerte celular (azul Tripán) se midieron después de la inanición celular durante 22 horas (véase texto) para sincronizar las células en el ciclo celular. A continuación, las células se expusieron a 2 µg/ml o 0,5 µg/ml de KGI 1 durante 24 horas. Los controles no tratados se muestrearon a las 24 horas. KGI 1 (2 µg/ml es decir, M2) y KGI libre (2 µg/ml es decir, F2) redujo la viabilidad celular después del tratamiento durante 24 horas. La concentración de 0,5 µg/ml de KGI 1 o KGI 1 libre redujo la viabilidad de las células después de un periodo de tratamiento de 24 horas. La inhibición metabólica era más prominente después del tratamiento con KGI 1 que después con la forma libre.

Fig. 10.1. KGI 1 induce la célula cancerosa U937 a una concentración LC50 de 3 µg/ml para producir 781pg/ml de IL-8.

Fig. 10.2. KGI 2 induce la célula cancerosa U937 a una concentración LC50 de 19 µg/ml para producir 880pg/ml de IL-8.

Fig. 10.3. KGI 3 induce la célula cancerosa U937 a una concentración de 14 µg/ml para producir 917pg/ml de IL-8.

#### **Descripción detallada de la invención**

**[0022]** La invención se refiere al uso de partículas que contienen lípidos que comprende al menos un lípido y al menos una saponina para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, la invención se refiere a un medicamento que comprende al menos un lípido y al menos una saponina para el tratamiento del cáncer.

**[0023]** De acuerdo con la invención, es la partícula LipD como tal y la saponina que dan el efecto de matar el cáncer. Se ha comprobado que, aunque las saponinas libres como tales pueden destruir las células cancerosas, también tienen un efecto negativo en las células normales. Junto con los lípidos o integrado en las partículas lipídicas, el efecto contra las células cancerosas se obtiene a una concentración que es 30 veces menor que la concentración de las saponinas libres que es tóxica para las células normales.

**[0024]** El partículas que contienen lípido puede elegirse de liposomas, de iscom y/o matriz de iscom y posintros.

#### **Liposomas**

**[0025]** Un liposoma es generalmente clúster esférico o esferoidal o compuestos agregados o anfipáticos, incluyendo restos lipófilos, típicamente en la forma de una o más capas concéntricas, por ejemplo, monocapas, bicapas o multicapas. Pueden también denominarse aquí vesículas lipídicas. Los liposomas se pueden formular, por ejemplo, a partir de lípidos iónicos y/o lípidos no iónicos. Los liposomas formulados a partir de lípidos no iónicos pueden denominarse niosomas. Los liposomas formados, al menos en parte, a partir de lípidos catiónicos o lípidos aniónicos pueden denominarse cocleados.

**[0026]** Los liposomas se pueden preparar por ejemplo como se describe por Lipford y Wagner (Lipford, Wagner et al. 1994) y en Gregoriadis, G. (Gregoriadis, McCormack et al. 1999), O'Hagan, DT (2001).

**[0027]** Se discuten técnicas preparatorias liposomales generales que pueden ser adaptadas para su uso en la preparación de composiciones liposomas que pertenecen a la presente invención, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos. 4.728, 578.4, 728.575, 4.737, 323.4, 533.254, 4.162, 282.4, 310.505 y 4.921, 706; Solicitud de patente británica GB 2193095A; Las solicitudes internacionales números de serie

**[0028]** PCT/US85/01161 y PCT/US89/05040; Mayer y otros (Mayer, Hope et al., 1986); (Hope et al., 1985); Mayhew et al. (Mayhew, Conroy et al., 1987); Mayhew et al (Mayhew, Lazo et al., 1984); Cheng et al., (Cheng, Seltzer et al., 1987); y Liposome Technology, Gregoriadis, G. (Gregoriadis, G., ed., 1984). Por consiguiente, las composiciones de liposomas pueden prepararse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas preparatorias liposómicas convencionales que serán evidentes para un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, diálisis con disolvente, prensa francesa, extrusión (con o sin congelación-descongelación), Evaporación en fase inversa, congelación-

descongelación simple, sonicación, diálisis de quelatos, homogeneización, infusión de disolventes, microemulsificación, formación espontánea, vaporización de disolventes, diálisis con disolventes, técnica de células de presión francesa, diálisis detergente controlada y otras, Las composiciones de diversas formas. Véase, por ejemplo, Madden et al., (Madden, Harrigan et al., 1990).

**[0029]** Técnicas de congelación-descongelación adecuadas se describen, por ejemplo, en el documento WO nº de solicitud PCT/US89/05040, presentada el 8 de noviembre de 1989. Se prefieren métodos que implican técnicas de congelación-descongelación en relación con la preparación de liposomas. La preparación de los liposomas se puede llevar a cabo en una solución, tal como una disolución salina acuosa, solución de tampón acuosa de fosfato, o agua estéril. Los liposomas pueden prepararse también mediante diversos procedimientos que implican sacudidas o agitación, lo que se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de un dispositivo mecánico de agitación, tal como un Wig-L-Bug. TM. (Crescent Dental, Lyons, III.), un Mixomat (Degussa AG Frankfurt, Alemania), un Capmix (Espe Fabrik Pharmazeutischer Praeparate GMBH & Co., Seefeld, Oberay Alemania), un Silamat Plus (Vivadent, Lechtenstein) o un Vibros (Quayle Dental, Sussex, Inglaterra). También se puede utilizar un equipo de microemulsificación convencional, tal como un Microfluidizer. TM. (Microfluidics, Woburn, Mass).

#### **Iscom y matrices Iscom**

**[0030]** Los iscoms comprenden al menos una saponina tal como al menos un glicósido, al menos un lípido y al menos un tipo de sustancia de antígeno. El lípido es al menos un esteroles tal como colesterol y opcionalmente también colina de fosfatidilo. Estos complejos también pueden contener una o más sustancias inmunomoduladoras (adyuvantes activas), y pueden producirse como se describe en los documentos EP 0 109 942 B1, EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 564 B1.

**[0031]** El complejo de matriz de iscom en las composiciones de la invención comprende al menos un glicósido y al menos un lípido. El lípido es al menos un esteroles tal como colesterol y opcionalmente también colina de fosfatidilo. La matriz tiene un efecto de inmunoenergización sobre las sustancias antigénicas co-administradas. Los complejos iscom pueden contener también una o más sustancias inmunomoduladoras (adyuvantes activos), no necesariamente una saponina, y pueden producirse como se describe en el documento EP 0 436 620 B1 y pueden producirse como se describe en esta patente.

**[0032]** Una o más partículas de iscom, una o más partículas de la matriz de iscom o de cualquier sub-fragmento de los anillos de 6 nanómetros de los mismos pueden ser utilizados. Se pueden usar cualquier mezcla de dicha matriz iscom, partículas o sub fragmentos.

#### **Posintros**

**[0033]** Posintros son complejos que comprenden: i) al menos un primer esteroles y/o al menos un segundo esteroles, en el que el al menos un segundo esteroles es capaz de ponerse en contacto con un antígeno extraño, preferiblemente un ácido nucleico por medio de una interacción seleccionada de una interacción electrostática y una interacción hidrófoba, y en la que el al menos un primer esteroles y/o al menos un segundo esteroles es capaz de formar un complejo con al menos una primera saponina y/o al menos una segunda saponina, y ii) al menos una primera saponina y/o al menos una segunda saponina, en la que la al menos una segunda saponina es capaz de poner en contacto un determinante genético por medio de una interacción seleccionada entre una interacción electrostática y una interacción hidrofóbica y en la que al menos una primera saponina y/o al menos una segunda saponina es capaz de formar un complejo con al menos un primer esteroles y/o al menos un segundo esteroles, y opcionalmente iii) al menos un grupo de contacto para poner en contacto un determinante genético por medio de una interacción seleccionada entre una interacción electrostática y una interacción hidrófoba, con la condición de que al menos un grupo de contacto esté presente cuando no esté presente un segundo esteroles en el complejo y opcionalmente i) al menos un resto lipófilo.

**[0034]** Posintros pueden adoptar una estructura de micro-partículas en la forma de una matriz en forma de jaula similar a la conocida como un estimulante inmune complejo (iscom). Al lado de las estructuras iscom, se ha informado que la interacción entre esteroides y saponinas da lugar a una diversidad de entidades estructurales diferentes, incluyendo entidades tales como, por ejemplo, celosías, panales de miel, barras y partículas amorfas, todas las cuales están cubiertas por la presente invención.

**[0035]** Posintros se describen en solicitudes de patente WO nº WO 2002/080981 y WO 2004/030696.

#### **Lípidos**

**[0036]** Los lípidos utilizados son particularmente los descritos en la patente del solicitante EP 0 109 942 B1, en particular, en la p. 3 y en la patente EP 0 436 620 B1 en la p. 7 líneas 7-24. Especialmente se usan esteroides tales como colesterol y fosfolípidos tales como fosfatidildimetilolamina y fosfatidilcolina. Se pueden usar receptores que contienen lípidos que se unen a los componentes de unión celular, tales como glicolípidos que incluyen el receptor de la toxina del cólera, que es el gangliósido GM1 y el antígeno de grupo sanguíneo fucoso. Los componentes de

unión a células pueden entonces funcionar como molécula de focalización de moco y unirse a las sustancias que contienen lípidos simplemente mediante la mezcla con complejos que las contienen. Los complejos Iscom que comprenden tales receptores y receptores se describen en el documento WO 97/30728

## 5 **Saponinas**

**[0037]** Las saponinas pueden ser cualquier saponina. De acuerdo con un aspecto de la invención, las saponinas son glucósidos obtenidos a partir de plantas. El glicósido vegetal puede elegirse entre sapogeínas y prosapogeninas con uno o más restos de azúcar. El glicósido puede ser una fracción de saponina cruda de *Quillaja Saponaria* Molina o una subfracción de la misma.

**[0038]** Saponina de *Quillaja* y diferentes fracciones de los mismos se han utilizado como adyuvante y en varias formulaciones de adyuvantes desde la 50ª y entre las fracciones más hidrófobas, por ejemplo QS21, se ha utilizado en vacunas animales y en los diferentes ensayos clínicos humanos (Kersten, Spiekstra et al. 1991); (Kensil, Patel et al., 1991). ISCOM o ISCOM MATRIX se han formado con diversas fracciones de *Quillaja* o con varias combinaciones de fracciones o saponina *Quillaja* más cruda. En todos los casos las formulaciones ISCOM o ISCOM MATRIX han causado menos reacciones locales que las formas libres. Los desarrollos recientes han diseñado formulaciones que tienen capacidad de mejora superior inmunitaria y son mucho más toleradas que cualquier otra formulación de saponina de *Quillaja* utilizada como adyuvante (Morein, Sundquist et al. 1984). Los componentes de estas formulaciones de saponina de *Quillaja* bien toleradas se utilizan en la presente invención para la destrucción de células cancerosas (KGI) y para el equilibrio de los efectos (BBE).

**[0039]** Las saponinas son complejos moleculares que constan de una aglicona a la que se unen una o más cadenas de azúcar. La saponina puede acilarse con ácidos orgánicos tales como acético, malónico como aparte de su estructura (Hostettmann K, y Marston A. 1995, Rouhi A.M. 1995, Leung A Y. y Foster S. 1996). Estos complejos tienen MW que oscilan entre 600 y más de 2000 kd. El aglicano hidrófobo y el resto de azúcar hidrófilo hacen una propiedad anfipática. En particular, los glicósidos triterpénicos son de interés. Otras saponinas caracterizadas por su aglicona son glucósidos esteroides y glucósidos de alcaloides esteroideos.

**[0040]** La saponina bruta de *Quillaja* se aisló primero en 1887 por Kobert, R., Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 23: 233-272, 1887.) Más tarde Dalsgaard purificó saponina de *Quillaja* (Dalsgaard, 1974). Higuchi, R. (Higuchi, R. 1988) informó de la estructura completa de saponina de *Quillaja* al reconocer una aglucona (ácido quillaico triterpenoide) que une dos restos de azúcar en dos posiciones diferentes. Los glicósidos útiles se describen en el documento EP 0 109 924 B1. Se prefieren saponinas y triterpensaponinas. Pueden ser en forma de extracto crudo de *Quillaja Saponaria* Molina" (Dalsgaard 1974), o cualquier subfracción del mismo como se describe en el documento PCT/US/88101842 a Kensil et al. (Kensil, Patel et al. 1991), (Kersten, Spiekstra et al., 1991). "Aspects of Iscoms. Analytical, Pharmaceutical and Adjuvant Properties; Thesis, Universidad de Utrecht, EP 0 362 279 B2 y EP 0 555 276 B1.

**[0041]** El término "fracción de una saponina de *Quillaja Saponaria* Molina." se utiliza a lo largo de esta especificación y en las reivindicaciones como una descripción genérica de una fracción semi-purificada o saponina definida de *Quillaja Saponaria* o una fracción sustancialmente pura. Es importante que la fracción no contenga tanta cantidad de otra fracción para afectar negativamente a los buenos resultados que se obtienen cuando se usan las mezclas de iscom o matriz iscom que comprende esencialmente una fracción. La preparación de saponina puede, si se desea, incluir cantidades menores, por ejemplo, hasta 40% en peso, tal como hasta 30% en peso, hasta 25% en peso, hasta 20% en peso, hasta 15% en peso, hasta 10% en peso, hasta 7% en peso, hasta 5% en peso, hasta 2% en peso, hasta 1% en peso, hasta 0,5% en peso hasta 0,1% en peso de otros compuestos tales como otras saponinas u otros materiales adyuvantes.

**[0042]** Las fracciones de saponina de acuerdo con la invención pueden ser las fracciones A, B y C descritas en el documento WO 96/11711, las fracciones B3, B4 y B4b descritas en el documento EP 0 436 620 Las fracciones QA1-22 descritas en el documento EP 0 3632 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Denmark), *Quillaja Saponaria* Molina Spikoside (Isconova AB, Ultunaallén 2B, 756 51 Uppsala, Suecia).

**[0043]** Las fracciones QA-1-2-3-4-5-6- 7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21 and 22 of EP 0 3632 279 B2, especialmente QA-7, 17-18 and 21 también se pueden utilizar. Se obtienen como se describe en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente en la página 6 y en el Ejemplo 1 en la página 8 y 9. Las fracciones A, B y C descritas en el documento WO 96/11711 se preparan a partir de la fracción lipófila obtenida en separación cromatográfica del extracto acuoso bruto *Quillaja Saponaria* Molina y elución con acetonitrilo al 70% en agua para recuperar la fracción lipófila. Esta fracción lipofílica se separa a continuación por HPLC semi preparativa con elución usando un gradiente de 25% a 60% de acetonitrilo en agua ácida. La fracción denominada en el presente documento como "Fracción A" o "QH-A" es, o corresponde a, la fracción, que se eluye a aproximadamente 39% de acetonitrilo. La fracción denominada en el presente documento como "Fracción B" o "QH- B" es, o corresponde a, la fracción, que se eluye a aproximadamente 47% de acetonitrilo. La fracción denominada en el presente documento como "Fracción C" o "QH-C" es, o corresponde a, la fracción, que se eluye a aproximadamente 49% de acetonitrilo.

**[0044]** Las saponinas de *Quillaja saponaria* Molina se pueden dividir en dos categorías diferentes;

(I) Las fracciones más hidrófobas tienen una cadena de acilo de ácido graso en la posición 4. Estas fracciones de saponina exhiben fuerte efecto lítico al hacer pequeños agujeros de aproximadamente de 12 nm en las membranas celulares. Tales fracciones de saponina matan irreversiblemente las células en formas libres, pero no necesariamente en la forma de partículas de complejos inmunoestimulantes con antígenos integrados (ISCOM) o la partícula similar sin un antígeno integrado es decir, la matriz de iscom en concentraciones moderadas (Ronnberg, Fekadu et al., 1997) y como se describe en la presente invención.

(II) Las saponinas de *Quillaja* más hidrófilas se pueden dar en concentraciones diez veces mayores o más antes de exhibir efectos líticos celulares. En forma de particulado, estas fracciones de saponina no tienen prácticamente ningún efecto tóxico celular o prácticamente ningún efecto tóxico in vivo.

**[0045]** Las formas de partículas del las formas más hidrófilas más hidrófobas y se describen como ISCOM MATRIX, que son esferas de 40 nm construidas por sub-fragmentos formados por el anillo de 6 nm (Ronnberg, Fekadu et al. 1995), (Lovgren y Morein 1991).

**[0046]** Las partículas de lípidos tales como iscom y matriz de iscom que comprenden saponinas hidrófobas, por ejemplo, que comprenden ácidos grasos se nombran partículas KGI en la presente invención (células tumorales asesinas y de inhibición del crecimiento). Tales saponinas pueden ser fracciones que contienen acilo graso por ejemplo, en la posición 4 en la aglicona triterpenoide de las saponinas de *Quillaja Saponaria* Molina, como fracción C y B de Quil A o fracciones de la región entre las fracciones A y B y las fracciones 15- 21 descritas en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente las fracciones 16, 17, 18 son adecuadas aquí.

**[0047]** Las partículas de lípidos tales como iscom y matriz de iscom compuesta con saponinas con saponinas hidrófilas por ejemplo, compuesta con el ácido graso se denominan partículas BBE (con el bloqueo de efecto de equilibrio y también efecto de matanza de células cancerosas). Las fracciones 4-15 de Quil A, especialmente 7-14 se describen en el documento EP 0 3632 279 B2 y la fracción A (QHA) son adecuadas aquí.

**[0048]** La partícula lipídica puede comprender al menos una saponina hidrófoba. También puede comprender al menos una saponina hidrófila. Al menos una saponina hidrófila y el al menos una saponina hidrófoba pueden estar en una y la misma o en diferentes partículas que contiene lípidos.

**[0049]** La fracción QHA de *Quillaja saponaria* Molina seleccionada debido a que no presenta efecto de matanza de células, pero exhibe efectos potentes de neutralización, bloqueo o, sobretodo, de equilibrio en las formulaciones KGI por ejemplo, un equilibrio entre la muerte de las células y la modulación hacia la diferenciación. El efecto de bloqueo y de equilibrio es, en adelante, contraído a BBE. Partículas KGI y BBE estimulan y modulan respuestas protectoras inmunes a antígenos. Se prevé que estas partículas pueden, por tanto, estimular las respuestas inmunes a los antígenos tumorales liberados de las células muertas por las partículas KGI, que por presentación cruzada pueden presentar antígenos. Alternativamente, BBE puede mejorar directamente la estimulación de células presentadoras de antígeno (APCs) a efectos anti-tumorales, así como la inducción de una respuesta inmune anti-tumor adquirida.

**[0050]** Por lo tanto, las partículas KGI y BBE, denominadas por sus funciones en esta invención, tienen propiedades diferentes de KGI, pueden bloquear irreversiblemente el crecimiento celular y eliminar las células cancerosas a concentraciones relativamente bajas, es decir, a una concentración de 30 a 40 veces inferiores a las de células humanas primarias o de ratón. Además, KGI como BBE tienen (tiene) un efecto potenciador inmune en antígenos o antígenos incorporados en su entorno liberados de las células o coadministrados: partículas BBE pueden ser co-administradas con partículas KGI con antígeno tumoral integrado o conseguir antígenos tumorales espontáneamente de cáncer por ejemplo, células destruidas por KGI o co-administran sustancias antigénicas, véase el documento EP 0 436 620 B1.

**[0051]** Tanto KGI como BBE comprenden al menos una saponina, tal como un glicósido y al menos un lípido si son iscoms y matrices de iscom que también comprende el colesterol de lípidos tal como se describe en el documento WO/1990/003184.

**[0052]** El partículas que contienen lípido que comprende saponinas hidrófobas que tienen un efecto letal sobre las células cancerosas también pueden comprender además saponinas hidrófilas.

**[0053]** Partículas que contienen el lípido pueden contener al menos dos fracciones de saponina diferentes en una y la misma partícula que contiene lípidos.

**[0054]** El partículas que contienen lípido también puede contener al menos dos fracciones de saponina diferentes, con lo que una de las al menos dos fracciones de saponina diferente es complejo unido en un lípido que contiene las partículas y la otra (las otras) de al menos dos diferentes fracciones de saponina es (son) complejo unido en otra (otras) partículas física(s) diferente(s) que contiene(n) lípidos.

**[0055]** Las diferentes saponinas pueden ser saponinas hidrófilas e hidrófobas respectivamente. La partícula puede

contener al menos la fracción C o al menos la fracción B o al menos cualquier fracción entre la fracción C y B de Quil A y al menos otra fracción de Quil A. Así, una partícula puede comprender fracción C solamente; fracción C y al menos otra fracción de Quil A; fracción C y una o más fracciones de Quil A; fracción C y la fracción A de Quil A; Quil A crudo. La partícula también puede contener fracción B solamente; la fracción B y al menos otra fracción de Quil A; la fracción B y una o más fracciones de Quil A; la fracción B y la fracción A de Quil A. Las combinaciones anteriores de las fracciones también pueden estar en diferentes partículas lipídicas o en una y la misma partícula lipídica. Las partículas KGI 1, KGI 2 y KGI 3 del Ejemplo 1 son ejemplos de tales partículas lipídicas.

**[0056]** De acuerdo con un aspecto de la invención, la partícula KGI puede comprender extracto crudo o en bruto de Quil A que comprende una mezcla de saponinas o una forma semipurificada tal como *Quillaja* Powder Extract (Berghausen, EE.UU.), *Quillaja* Ultra Powder QP UF 300, *Quillaja* Ultra Powder QP UF 1000 o Vax-Sap (los tres de Natural Responses, Chile). Las fracciones de saponina purificadas C y B solitarias o combinadas con A se utilizan en partículas KGI mientras que A se utiliza en partículas BBE según la invención. Las fracciones B y C se describen en el documento WO 96/11711, las fracciones B3, B4 y B4b descritas en el documento EP 0 436 620. Las fracciones QA1-22 descritas en el documento EP 0 3632 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS Dinamarca), *Quillaja saponaria* Molina Spikoside (Isconova AB, Uppsala Science Park, 751 83, Uppsala; Suecia). Tales partículas KGI se denotan KGI 3 los ejemplos.

**[0057]** Ejemplos de saponinas útiles en las partículas KGI son la fracción QHC de Quil A y diferentes combinaciones de la QHC y las fracciones QHA de Quil A mencionadas anteriormente. En los ejemplos las partículas KGI 1 sólo contienen fracción QHC. Las partículas KGI 2 contienen 30% de QHC y 70% de QHA. También se pueden usar todas las otras combinaciones de fracciones de Quil A (saponina de *Quillaja*) mencionadas anteriormente.

**[0058]** Las células tumorales son células indiferenciadas que crecen rápidamente. Las células tumorales son, por lo tanto (también) sensibles a ciertas sustancias tóxicas celulares. El concepto según la invención es el uso de sustancias en forma de partículas (nombre de trabajo KGI 1, KGI 2 y KGI 3 y BBE), basadas en fracciones o combinaciones de fracciones de *Quillaja saponaria* Molina que tienen efecto tóxico y/o modulador en (para) células de crecimiento rápido como los de los cánceres malignos sin excluir los cánceres benignos. El efecto tóxico o modulador puede medirse en el nivel celular. La sustancia de célula tóxica - célula moduladora, es decir, la saponina está integrada en una o más partículas de administración. Otra partícula, además del efecto tóxico o modulador celular, también puede utilizarse para bloquear la toxicidad (nombre de trabajo BBE). Es decir, un sistema de matanza equilibrado para las células tumorales puede crearse. En el sistema de suministro, se puede incorporar un modulador inmune que estimula la supervivencia y activar las células a la diferenciación. La estimulación puede incluir además la inducción de células T citotóxicas siendo el principal tipo de células de defensa inmune para la eliminación del cáncer. Células que mueren del sistema linfático también pueden contribuir a la estimulación de las CD viables mediante la denominada presentación cruzada. Aquí, una célula monoblastoide derivada de monocitos representa la célula tumoral de linfoma y la célula normal es de origen derivado de monocitos de células dendríticas.

**[0059]** Mediante la combinación de complejos KGI y BBE preparados a partir de *Quillaja* saponaria Molina es posible preparar preparativos que tienen propiedades diferentes y complementarias tales como menor toxicidad celular que las partículas KGI, la activación de células complementarias y la diferenciación y prominente efecto inmuno-modulador. Los efectos de las partículas KGI y BBE son mediados por receptores como se destaca por el efecto de bloqueo por BBE en KGI para causar citotoxicidad de las células del cáncer. Por lo tanto, el efecto de matar la célula cancerosa de KGI en las células U937 utilizadas como modelo en esta invención no se identifica en partículas BBE. Sin embargo, la BBE exhibe el efecto de matar en algunas otras células cancerosas. El receptor común ejerce activación y diferenciación de células cancerosas, que en las células normales es compatible con o parcialmente compatible con actividad adyuvante que resulta en la producción de citoquinas y la expresión de moléculas por ejemplo, de comunicación, por ejemplo, CD 86. CD 86 comunica células dendríticas (DC) con poblaciones de linfocitos resultantes en las respuestas específicas de antígeno, la falta de los cuales en por ejemplo, los recién nacidos o ancianos dificulta la respuesta inmune. Se ha descubierto por los inventores que la fracción QHA (componente en BBE y KGI 2) y QHC (componente en KGI 1 y KGI 2) activan y diferencian la respuesta inmune de los recién nacidos que albergan sistemas inmunes innatos y adquiridos sin desarrollar o incompletamente diferenciados (Hu et al., 2004, Morein y Hu 2007). El receptor que provoca la eliminación de células cancerosas a través de la apoptosis está presente en partículas KGI pero no se observa en partículas BBE. Sin embargo, no se puede excluir que BBE provoca la apoptosis en otras células cancerosas. No puede excluirse que un receptor que mata células cancerosas por sí solo o en combinación con un segundo receptor puede provocar efectos secundarios. En particular, se tiene que considerar que hay diferencias en las especies que conforman una actividad de receptor o una combinación de actividades del receptor de provocar efectos secundarios. Se desea un sistema con capacidad para hacer frente a tales problemas y la combinación de KGI y BBE da esa posibilidad.

**[0060]** Por lo tanto, la eliminación KGI de las células está mediada por el receptor ya que este efecto puede ser bloqueado por BBE. Se piensa que el receptor común (de bloqueo) durante KGI y BBE es diferente del receptor de la mediación de matar células U937 sólo por fracción de saponina QHC que contiene KGI 1. De lo contrario BBE también debe ser un matador de células cancerosas U937 utilizado en estos experimentos. El principio activo de BBE es QHA. Cuando está presente en la misma partícula como KGI 2 designada QHC modera el efecto de matar células por dilución de "receptores de matar en QHC", modificando alternativamente la estructura, lo que resulta en

menos afinidad entre ligandos y receptores activos en la destrucción de células. En contraste, en diferentes partículas hay un bloqueo por el receptor común.

**[0061]** El uso de preparaciones de saponina de acuerdo con esta invención da como resultado productos con una mayor tolerabilidad, inmunogenicidad incrementada de biodisponibilidad. Las preparaciones pueden usarse en métodos para adaptar la inmunogenicidad incluyendo un mayor control de enfermedades inflamatorias, hipersensibilidad y reacciones alérgicas. Esto puede ser especies dependientes y puede afectar la toxicidad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad.

**[0062]** Se ha demostrado que cuando las mezclas de partículas que contienen lípido que comprende al menos una saponina hidrófila, por ejemplo la fracción A de Quil A (por ejemplo, una partícula BBE) se utiliza junto con partículas que contienen lípido que comprende al menos una saponina hidrófoba por ejemplo la fracción C de Quil A (por ejemplo KGI 1, KGI 2 y KGI 3) se obtiene un efecto sinérgico anticáncer.

**[0063]** La al menos una saponina hidrófila puede ser una o más de las fracciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 de Quil A, especialmente fracciones 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se describe en el documento EP 0 3632 279 B2 y la fracción A de Quil A o Quil A crudo.

**[0064]** La al menos una saponina hidrófoba puede ser una o más saponinas que sí contienen cadena de acilo graso por ejemplo, en la posición 4 en la aglicona triterpenoide de las saponinas de *Quillaja Saponaria* Molina, tal como fracción C y B de Quil A o fracciones de la región entre las fracciones A y B y las fracciones 15, 16, 17, 18, 19, 10 y 21 descritas en el documento EP 0 3632 279 B2, especialmente las fracciones 17 y 18 son adecuadas aquí.

**[0065]** El partículas que contienen lípido para tal efecto simbiótico puede elegirse entre iscom y partículas de iscom de la matriz, liposomas y posintros.

**[0066]** Cualquier relación de saponinas hidrófilas e hidrófobas tales como subfragmentos de saponinas de *Quillaja Saponaria* Molina pueden utilizarse. Además, cualquier combinación de diferentes subfragmentos de saponinas hidrófilas e hidrófobas de *Quillaja Saponaria* Molina pueden utilizarse. Por lo tanto, una, dos o más saponinas hidrófilas e hidrófobas tales como subfragmentos de saponinas de *Quillaja Saponaria* Molina cada uno pueden estar integrados en partículas que contienen lípidos físicamente iguales o físicamente separadas.

**[0067]** Cualquier combinación de % en peso de las diferentes partículas que contienen lípidos, tales como iscom, complejos de matriz de iscom, liposomas o posintros basados en su contenido de saponina hidrófila por ejemplo, la fracción A y saponina hidrófoba por ejemplo C de *Quillaja Saponaria* Molina respectivamente pueden utilizarse. Las mezclas pueden comprender de, 0,1 a 99,9 en peso, de 5 a 95% en peso, 10 a 90% en peso de 15 a 85% en peso, de 20 a 80% en peso, de 25 a 75% en peso, 30 a 70% en peso, 35 a 65% en peso, 40 a 60% en peso, 45 a 55% en peso, 40 a 60%, en peso, de 50 a 50% en peso, 55 a 45% en peso, 60 a 40% en peso, 65 a 35% en peso, 70 a 30% en peso, 75 a 25% en peso, 80 a 20% en peso, 85 a 15% en peso, 90 a 10% en peso, 95 a 05% en peso, de partículas que contienen lípidos, p.ej. complejos de iscom que comprenden saponina hidrófila por ejemplo, la fracción A de *Quillaja Saponaria* Molina y el resto hasta el 100% en cada caso de intervalo de partículas que contienen lípidos, por ejemplo, complejos iscom que comprenden saponina hidrófoba. por ejemplo, la fracción C de *Quillaja Saponaria* Molina, contada sobre el contenido de la suma de saponinas hidrófilas e hidrófobas, por ejemplo las fracciones A y C de *Quillaja Saponaria* Molina en los complejos de iscom. Esto se aplica a lípidos que contienen partículas que comprenden tanto saponinas hidrófilas como hidrófobas o mezclas de partículas lipídicas que sólo contienen saponinas hidrófobas o hidrófilas.

**[0068]** De este modo, un partículas que contienen lípido puede comprender de 75% a 99,5% en peso de saponina hidrófila por ejemplo, la fracción A de Quil A y 0,5% a 25% en peso de saponina hidrófoba por ejemplo la fracción C de Quil A; 80% a 95% de saponina hidrófila y 5 a 20% de saponina hidrófoba; 85% a 90% de saponina hidrófila y 10 a 15% de saponina hidrófoba tal como 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 96%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% en peso de saponina hidrófila por ejemplo, la fracción A y 0,5% 1%. 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% en peso de saponina hidrófoba por ejemplo fracción C.

**[0069]** Todos los intervalos mencionados anteriormente se pueden usar para cualquier combinación de cualquier fracción de *Quillaja Saponaria* Molina en las formulaciones para la administración a cualquier tipo de especie humana o de animales. Ejemplos de especies animales a los que las formulaciones de acuerdo con la invención pueden administrarse son animales de compañía tales como gatos, perros, caballos, aves como loros, especies económicas importantes tales como ganado, especies, por ejemplo de la especie bovina, cerdos, ovejas, cabras. Preferiblemente más del 50% en peso de la fracción C se utiliza en combinación con cualquiera de las otras fracciones y especialmente en combinación con fracción A. Por lo tanto de 50,5 - 99,5% en peso de C y 0,5 - 49,5% en peso de A pueden utilizarse.

**[0070]** Cuando se prepara como se describe en el presente documento, las Fracciones A, B y C de *Quillaja Saponaria* Molina representan cada uno grupos o familias de moléculas químicamente estrechamente relacionadas

con propiedades definibles. Las condiciones cromatografías bajo las cuales se obtienen son tales que la reproducibilidad lote a lote en términos de perfil de elución y la actividad biológica es altamente consistente.

#### **Antígenos en las partículas que contienen lípidos**

**[0071]** Partículas que contienen lípido (tales como liposomas, posintros, iscom, matriz de iscom, BBE y/o KGI) pueden comprender antígenos de cáncer integrado en las partículas, junto a las partículas o mezclado con partículas que contienen lípido. Estos antígenos del cáncer pueden ser utilizados para provocar la inmunidad contra el cáncer.

**[0072]** El antígeno tumoral puede ser del tipo del tumor bajo tratamiento, o partículas que contienen lípido por ejemplo, el KGI pueden causar la liberación de antígenos tumorales después de matar la célula tumoral y causar o mejorar la iniciación de la respuesta inmune anti-tumor por la presentación cruzada a células presentadoras de antígeno (APCs). BBE también puede contener antígeno tumoral seleccionado e iniciar la respuesta inmune a antígenos tumorales co-administrados o de aparición espontánea, por ejemplo liberados por partículas de KGI que matan las células tumorales.

Tantas partículas que contienen lípidos antígenos, por ejemplo, iscoms como partículas que contienen lípidos que no contienen antígenos por ejemplo matrices de iscom pueden utilizarse de acuerdo con la invención. Partículas que contienen lípido que comprenden también antígenos tales como iscoms se destinan principalmente a la actividad contra las células cancerosas establecidas. Las partículas que contienen lípidos como matrices de iscom que sí contienen antígenos pueden de acuerdo con una forma de realización contienen al menos un antígeno de cáncer. Según otra realización, no contienen antígenos del cáncer.

**[0073]** El inmunógeno que se incorpora en iscoms puede también estar asociado con la matriz de iscom y puede ser cualquier entidad química que puede inducir una respuesta inmune en un individuo tal como (pero no limitado a) un humano u otro animal, incluyendo pero no limitado a un humoral y/o respuesta inmune mediada por células a las bacterias, virus, micoplasmas u otros microorganismos. El inmunógeno específico puede ser una proteína o péptido, un carbohidrato, polisacárido, un lipopolisacárido o un lipopéptido; o puede ser una combinación de cualquiera de estos.

**[0074]** En particular, el inmunógeno específico puede incluir una proteína nativa o un fragmento de proteína, o una proteína sintética o un fragmento de proteína o péptido; puede incluir glicoproteína, glicopéptido, lipoproteína, lipopéptido, nucleoproteína, nucleopéptido; puede incluir un conjugado de péptido-péptido; se puede incluir un producto de expresión de ácido nucleico recombinante.

**[0075]** Ejemplos de tales inmunógenos se citan en el documento EP 0 109 942 B1 e incluyen, pero no se limitan a, aquellos que son capaces de provocar una respuesta inmune contra la hepatitis viral o bacteriana, influenza, difteria, tétanos, tos ferina, sarampión, paperas, rubéola, polio, neumococo, el herpes, el virus sincitial respiratorio, gripe de hemofilias, la clamidia, el virus de la varicela-zóster, la rabia o el virus de la inmunodeficiencia humana.

**[0076]** Los antígenos se pueden incorporar en iscom o acoplados a iscom o matriz de iscom o mezclados con iscom y/o matriz de iscom. Cualesquiera mezclas de tal iscom o matriz de iscom se pueden utilizar. Uno o más antígenos se pueden utilizar y un antígeno de transporte y de pasajeros se pueden usar como se describe en el documento EP 9600647-3 (PCT/SE97/00289).

#### **Adyuvantes.**

**[0077]** Las partículas que contienen lípido se pueden utilizar como sistemas de administración para otros componentes. Un tipo de tales componentes que puede ser administrado en partículas que contienen lípidos o mezclados con los mismos es adyuvante. Por lo tanto, otros adyuvantes distintos de saponinas pueden estar integrados en partículas que contienen lípido, junto a las partículas o mezclado con ellos. Efectos adyuvantes considerados en la terapia del cáncer y en desarrollo como agentes terapéuticos, por ejemplo, ésteres de forbol, vitamina A2 y vitamina D3.

**[0078]** Las partículas de esta invención pueden contener otro inmunoestimulante y componentes de mejora que saponinas por ejemplo, lipopolisacáridos (LPS), lípido A, CTB, CTA o CTA1-DD. BBE y KGI también pueden contener otros agentes destructores de células cancerosas o sustancias tóxicas de células tales como la toxina del cólera (TK) o fracciones del mismo, toxina E. coli de calor lábil (LT) o subfracciones de los mismos.

**[0079]** Por otra parte, todos los tipos de saponinas mencionados anteriormente pueden usarse como tales adyuvantes adicionales.

**[0080]** Las soluciones o suspensiones también podrían comprender al menos uno de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabeno de metilo, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido

tetraacético de etileno de diamina, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o múltiples recipientes de dosis hechos de vidrio o plástico.

[0081] Los ejemplos de otros adyuvantes que se pueden incorporar en el iscom y matriz de iscom son cualquier adyuvante, natural o sintético, con efecto inmunomodulatorio deseado, por ejemplo dipéptido de muramilo (MDP) de derivados, tales como ácido graso, sustituido MDP, análogos de treonilo de MDP; DDA, poli aniones tales como sulfato de dextrano, lipopolisacáridos tales como saponinas (distintos de Quil A). Perspectivas de futuro de adyuvantes de vacunas (Warren y Chedid 1988); "Characterisation of a non-toxic monophosphoryl lipid A" (Johnson, Tomai et al., 1987); "Developmental status of synthetic immunomodulators" (Berendt y Ives 1985); "Immunopotentiating conjugates", (Stewart-Tull 1985), (Morein et al. 2007).

### **Agentes anti-cáncer**

[0082] Las partículas que contienen lípidos también se pueden utilizar como sistemas de suministro para agentes contra el cáncer. Pueden ser administrados en partículas que contienen lípidos o mezclados con los mismos.

[0083] KGI y BBE se pueden usar como sistemas de suministro también para otros fármacos contra el cáncer en particular la muerte por otros mecanismos. KGI y BBE contribuyen con la matanza silenciosa sobre la diferenciación de activación que conduce a la apoptosis. Otros agentes terapéuticos tienen otros efectos de eliminación de células cancerosas. Las combinaciones sin duda contribuirán a evitar la reversión de las células cancerosas haciéndolas resistentes al tratamiento.

[0084] Los otros agentes anti-cáncer se seleccionan preferiblemente de saber, compuestos de coordinación de platino, compuestos de taxano, compuestos de camptotecina, alcaloides de la vinca antitumorales, derivados de nucleósidos anti-tumorales, mostaza nitrogenada o agentes nitrosourea alquilantes, derivados de antraciclina antitumorales, trastuzumab y derivados de podofilotoxina antitumorales.

[0085] El término "compuesto de coordinación de platino" se usa aquí para denotar cualquier compuesto de coordinación de platino inhibidor de crecimiento de células tumorales que proporciona platino en forma de un ion. Compuestos de coordinación de platino preferidos incluyen cisplatino, carboplatino, cloro (dietilentriammina)-cloruro de platino (II); dicloro (etilenodiamina) de platino (II); diamina (1,1-ciclobutanodicarboxilato)-platino (II) (carboplatin); espiroplatino; iroplatino; diamina (2-etilo-malonato)-platino (II); (1, 2-diaminociclohexano) malonatoplatino (II); (4-carboxifitalo) (1,2-diaminociclohexano)-platino (II); (1,2-diaminociclohexano)-(isocitrato)-platino (II); (1,2-diaminociclohexano)-cis-(piruvato) platino (II); y (1,2-diaminociclohexano)- oxalato-platino (II); ormaplatino y tetraplatino.

[0086] El cisplatino está disponible comercialmente por ejemplo bajo el nombre comercial Platinol de Bristol Myers Squibb Corporation como un polvo para su constitución con agua, solución salina estéril u otro vehículo adecuado. Otros compuestos de coordinación de platino y sus composiciones farmacéuticas están disponibles comercialmente y/o se pueden preparar por técnicas convencionales.

[0087] El compuesto de taxano puede ser los que se venden bajo el nombre comercial Taxol a partir de Bristol Myers Squibb y docetaxel está disponible comercialmente bajo el nombre comercial de Taxotere de Rhone-Poulenc Rorer. Ambos compuestos y otros compuestos de taxano se pueden preparar de manera convencional por ejemplo como se describe en EP 253738, EP 253739 y WO 92/09589 o mediante procedimientos análogos a ellos.

[0088] Los compuestos de la camptotecina incluyen irinotecán y topotecán. El irinotecan está comercialmente disponible, por ejemplo, de Rhone-Poulenc Rorer bajo el nombre comercial Campto y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la memoria de patente europea n°137145 o por procesos análogos a los mismos. El topotecán está disponible comercialmente por ejemplo de SmithKline Beecham bajo el nombre comercial Hycamtin y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la memoria de patente europea n°321122 o mediante procedimientos análogos. Otros compuestos de camptotecina se pueden preparar de manera convencional por ejemplo por procedimientos análogos a los descritos anteriormente para irinotecán y topotecán.

[0089] Alcaloides de la vinca anti-tumorales incluyen vinblastina, vincristina y vinorelbina mencionados anteriormente. La vinblastina se encuentra comercialmente disponible por ejemplo como la sal de sulfato para inyección a partir de Eli Lilly and Co bajo el nombre comercial Velban, y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la especificación de patente alemana n° 2124023 o mediante procedimientos análogos a ellos. La vincristina está comercialmente disponible por ejemplo como la sal de sulfato para inyección a partir de Eli Lilly and Co bajo el nombre comercial Oncovin y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la anterior especificación de patente alemana n° 2.124.023, o por procesos análogos a los mismos. La vinorelbina está comercialmente disponible por ejemplo como la sal de tartrato para inyección de Glaxo Wellcome bajo el nombre comercial NaVelbine y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos n°

4.307.100, o por procesos análogos a estos otros alcaloides de la vinca antitumoral se pueden preparar de manera convencional por ejemplo por procedimientos análogos a los descritos anteriormente para vinoblastine, vincristina y vinorelbina.

**[0090]** Derivados de nucleósidos anti-tumorales incluyen 5-fluorouracilo, gemcitabina y capecitabina mencionados anteriormente. 5-Fluorouracilo está ampliamente disponible comercialmente, y se puede preparar por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos nº 2802005. La gemcitabina está disponible comercialmente por ejemplo de Eli Lilly bajo el nombre comercial Gemzar y pueden prepararse por ejemplo como se describe en la especificación de patente europea nº 122707 o por procedimientos análogos a los mismos.

**[0091]** La capecitabina está disponible comercialmente por ejemplo de Hoffman-La Roche bajo el nombre comercial Xeloda y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la memoria de patente europea nº 698611 o mediante procedimientos análogos. Otros derivados de nucleósidos anti-tumorales se pueden preparar de manera convencional por ejemplo por procedimientos análogos a los descritos anteriormente para capecitabina y gemcitabina.

**[0092]** Los compuestos de mostaza nitrogenada incluyen ciclofosfamida y clorambucilo. La ciclofosfamida es disponible comercialmente por ejemplo de Bristol-Myers Squibb bajo el nombre comercial Cytoxan y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la especificación de patente de Reino Unido nº 1,235.022 o mediante procedimientos análogos. El clorambucilo está disponible comercialmente por ejemplo de Glaxo Wellcome bajo el nombre comercial Leukeran y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos nº 3.046.301, o por procesos análogos a los mismos. Compuestos de nitrosourea preferidos para uso de acuerdo con la invención incluyen carmustina y lomustina mencionados anteriormente. Carmustina está disponible comercialmente por ejemplo de Bristol-Myers Squibb bajo el nombre comercial BiCNU y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la especificación de patente europea nº 902015, o por procedimientos análogos a los mismos. Lomustina está disponible comercialmente por ejemplo de Bristol-Myers Squibb bajo el nombre comercial CeeNU y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos nº 4.377.687, o por procesos análogos a los mismos.

**[0093]** Derivados de antraciclina antitumorales incluyen daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina mencionados anteriormente. Daunorrubicina está comercialmente disponible por ejemplo como la sal de hidrocloreto a partir de Bedford Laboratories bajo el nombre comercial Cerubidina, y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos nº 4.020.270, o por procesos análogos a los mismos.

**[0094]** La doxorubicina está comercialmente disponible por ejemplo como la sal de hidrocloreto a partir de Astra, y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos nº 3.803.124 o mediante procedimientos análogos. La idarubicina se encuentra comercialmente disponible por ejemplo como la sal de hidrocloreto a partir de Pharmacia & Upjohn bajo el nombre comercial Idamicina, y se pueden preparar por ejemplo como se describe en especificación de patente de EE.UU. nº 4.046.878, o por procesos análogos. Otros derivados de antraciclina antitumoral pueden prepararse de manera convencional por ejemplo por procedimientos análogos a los descritos anteriormente para daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina.

**[0095]** Trastuzumab está comercialmente disponible de Genentech bajo el nombre comercial Herceptina y puede obtenerse como se describe en la patente de Estados Unidos nº 5821337 o en especificaciones de patente PCT WO 94/04679 y WO 92/22653.

**[0096]** Derivados antitumorales de podofilotoxina antitumorales incluyen etopósido y tenipósido. El etopósido es comercialmente disponible por ejemplo de Bristol-Myers Squibb bajo el nombre comercial VePesid, y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la especificación de patente europea nº 111058, o por procesos análogos a los mismos. El tenipósido está disponible comercialmente por ejemplo de Bristol-Myers Squibb bajo el nombre comercial Vumon y se pueden preparar por ejemplo como se describe en la memoria de patente PCT nº WO 93/02094, o mediante procedimientos análogos. Otros derivados podofilotoxina antitumorales se pueden preparar de manera convencional por ejemplo por procedimientos análogos a los descritos anteriormente para etopósido y tenipósido.

**[0097]** Las saponinas en forma cruda o fracciones de las mismas tales como las mencionadas anteriormente también pueden usarse en forma libre, es decir, no integrarse en partículas que comprenden lípidos, como agentes anti-cancerosos. Estos compuestos anticancerosos se pueden mezclar con, unirse a o integrarse en partículas que contienen lípidos tales como liposomas, de iscom y/o matriz de iscom y posintros.

**[0098]** Es conveniente si son hidrófobos cuando se integran. Si no, los grupos hidrófobos pueden ser acoplados a ellos como se describe en el documento EP 242380.

**[0099]** Los compuestos no hidrofóbicos y, especialmente, proteínas o péptidos se pueden hacer hidrófobos por acoplamiento de grupos hidrófobos.

**[0100]** El grupo hidrófobo que se puede acoplar a los compuestos no hidrófobos son cadenas alifáticas ramificadas saturadas o insaturadas rectas, que tienen preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9; 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos de carbono, o aminoácidos hidrófobos o péptidos u otras estructuras hidrófobas tales como esteroides. La longitud de la estructura hidrofóbica se adapta al tamaño y la naturaleza de la proteína. Como ejemplo, se puede mencionar que un péptido con 10-15 aminoácidos (virus de la fiebre aftosa) es adecuadamente llevado a cabo con dos tirosinas en el extremo terminal de amino o carboxi. Una proteína con un peso molecular de 70,000 daltons exige aproximadamente 20 aminoácidos hidrófobos. La prueba se realizó de forma empírica. Por lo tanto, se utiliza especialmente péptidos con 1 a 20 aminoácidos, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 aminoácidos, especialmente elegidos entre Trp, Ile, Phe, Pro, Tyr, Leu, Val, especialmente Tyr; derivados de colesterol tales como ácido colina, ácido de ursodesoxicolina.

**[0101]** Estos grupos hidrófobos deben estar unidos a un grupo que puede ser acoplado a la proteína o compuestos no hidrófobos tales como carboxilo, amino, disulfuro-, hidroxilo, sulohidrido- y el grupo carbonilo, tales como grupos aldehído.

**[0102]** Como grupos hidrófobos que pueden ser acoplados se seleccionan preferiblemente carboxilo, aldehído, amino, derivados de hidroxilo, y disulfuro de metano, dimetilo, propano, butano, hexano, heptano, octano y los péptidos que contienen Cys, Asp, Glu, Lys, preferiblemente octanal y Tyr.Tyr.Tyr-Cys,-Asp o -Glu. Los grupos hidrófobos con un grupo que se puede acoplar debe ser disuelto en agua con la ayuda de, por ejemplo, los agentes solubilizantes y detergentes mencionados anteriormente o ácido clorhídrico, ácido acético 67% en ácido acético de volumen, licor cáustico, amoniaco, dependiendo de qué sustancia se ha de disolver. pH se ajusta entonces a la dirección neutral sin la sustancia precipitante; aquí es para asegurarse de que no se obtiene un valor de pH que desnatura la proteína a la que el grupo hidrófobo se ha de acoplar. Lípidos pueden mejorar la solubilización.

**[0103]** La molécula hidrófoba puede añadirse al compuesto no hidrófobo en la relación molar de 10:1 a 0,1:1, preferiblemente 1:1.

**[0104]** Los grupos hidrófobos con un grupo carboxilo como molécula de acoplamiento pueden ser acoplados a la proteína a través de carbodiimidas de agua soluble o anhídridos compuestos. En el primer caso, el grupo carboxilo se activa a pH 5 con carbodiimida y se mezcla con la proteína disuelta en tampón de pH 8 con un alto contenido de fosfato. En el último caso se hace reaccionar el compuesto carboxi, con cloroformiato de isobutilo en presencia de trietilamina en dioxano o acetonitrilo, y se añade el anhídrido resultante a la proteína a un pH de 8 a 9. También es posible convertir el grupo carboxilo con hidrazina para hidrazida que junto con aldehídos y cetonas en unidades de azúcar oxidado con peryodato en la proteína da enlaces hidrazona.

**[0105]** Los grupos amino con ácido nitroso pueden a una temperatura baja convertirse en sales de diazonio, que dan enlaces de azo con Tyr, His y Lys.

**[0106]** Los grupos hidroxilo con anhídrido succínico pueden ser convertidos a hemisuccinato de derivados que se pueden acoplar como grupos carboxilo.

**[0107]** Los grupos de aldehído se pueden hacer reaccionar con grupos amino en la proteína a una base de Schiff.

**[0108]** Varios grupos y métodos de acoplamiento se describen en el Journal of Immunological Methods (Blair y Ghose 1983), (Conradie, Govender et al. 1983), Methods in Enzymology (Ghose, Blair et al. 1983), y en Analytical BioChemistry (Davis y Preston, 1981).

**[0109]** Las proteínas, péptidos o compuestos así producidos que han recibido grupos hidrófobos son se unen por complejo con glicósido, como se describe en a), pero aquí las etapas de purificación para la eliminación de fragmentos de células se pueden omitir.

**[0110]** Proteínas hidrófilas que tienen grupos hidrófobos encerrados se pueden hacer hidrófobas haciendo que los grupos hidrófobos sean accesibles por desnaturalización suave de las proteínas, es decir, con un pH bajo de aproximadamente 2,5, urea 3M o a una alta temperatura por encima de 70 grados C. Tales proteínas pueden ser inmunoglobulinas tales como IgG, IgM, IgA, IgD e Ig E. Las inmunoglobulinas pueden ser utilizadas como anticuerpos antiidiotipos. Las proteínas se obtienen en forma purificada como proteínas como se describe en (b) y luego complejos unidos a glicósido como se describe en (a), se han omitido las etapas de purificación para la eliminación de fragmentos de células.

#### **Orientación de moléculas para partículas que contienen lípidos.**

**[0111]** El partículas que contienen lípidos puede comprender además moléculas de cáncer de orientación tales como antígenos de superficie de células cancerosas, antígenos de superficie de virus y antígenos de la gripe.

**[0112]** La presente solicitud de patente demuestra que las partículas que contienen lípidos tales como partículas de KGI y BBE matan o inhiben el crecimiento de una serie de diferentes células cancerosas a dosis fisiológicas bajas. Estos tipos de partículas utilizados como adyuvante en iscom y formulaciones de matriz de iscom también muestran

una buena biodisponibilidad, y la capacidad de focalización de sistema linfático, en particular, a las células dendríticas (para referencias, véase Morein et al. 2007). Para aumentar aún más el efecto de orientación en las moléculas in vivo de orientación pueden incorporarse por varios métodos. Moléculas de la superficie de las membranas microbianas se pueden incorporar mediante interacción hidrófoba como se describe originalmente por Morein et al. (1984) y en el documento EP 242380. Otras moléculas por ejemplo, producidas mediante tecnología de ADNr o producidas sintéticamente se pueden incorporar tal como se describe en el documento WO 2002/080981 y WO 2004/030696.

Tales moléculas de direccionamiento incluyen proteínas de virus tales como influenza y virus sincitial respiratorio que tienen afinidad para las vías respiratorias por ejemplo, para orientar las formas de cáncer de pulmón, o CTA1DD siendo la parte A1 de la subunidad A de la toxina del cólera incorporado en formulaciones KGI o BBE como se describe por N. Lycke (2004) y por Mowat et al. (2001). CTA1 DDIs diseñadas racionalmente de tres componentes principales, contribuyendo cada uno efectos complementarios.

CTA1 es la subunidad enzimáticamente activa de la toxina del cólera que se hace no tóxica por la separación de las subunidades A2 y B. Fusionado a DD de la proteína A de *Staphylococcus aureus* se dirige a las células B. Por lo tanto, es especialmente adecuado para células B linfomas. Ya se ha incorporado en iscoms para atacar a las células B para la estimulación inmune mejorada. En el iscom, además de su efecto de orientación, también tiene un efecto de activación y diferenciación complementando la de la iscom o las partículas de KGI o BBE. El efecto de orientación puro se obtiene a partir de la molécula de la subunidad DD de la proteína A de *Staphylococcus aureus* es una alternativa para CTA1 como un resto de direccionamiento para partículas BBE o KGI posiblemente complementadas con otros productos farmacéuticos de tratamiento. Más en general, mono y policlonales se pueden incorporar en las partículas que contienen lípidos, por ejemplo, en partículas KGI y BBE como se describe en el documento EP 0 109 942 B1, EP 0 242 380 B1 y EP 0 180 564 B1.

#### **Otros aditivos.**

[0113] Las composiciones según la invención pueden comprender además un vehículo, diluyente, excipiente o aditivo farmacéuticamente aceptable.

[0114] Vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cualquiera y todos los disolventes convencionales, medios de dispersión, cargas, vehículos sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica, y se describe, a modo de ejemplo, en *Pharmaceutical Sciences* de Remington, 18ª Edición, Mack Publishing Company, Pennsylvania, EE.UU. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se contempla. Ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

#### **Formas farmacéuticas**

[0115] La partícula que contiene lípidos se puede administrar al hombre y al animal por cualquier vía. Una ruta parenteral puede ser utilizada. El término parenteral tal como se utiliza en este documento incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intradérmica de técnicas de infusión, por menos de inyección de aguja - inyección a chorro, así como las administraciones oral, en aerosol.

[0116] Partículas que contienen lípidos de acuerdo con la invención que comprende cada una esencialmente por lo menos un tipo de saponina se pueden administrar en una composición como una mezcla o por separado en diferentes composiciones en el mismo sitio de administración o en diferentes sitios de administración en el mismo o en diferentes veces. Diferentes fracciones de *Quillaja Saponaria* Molina se pueden utilizar en los diferentes complejos de iscom y complejos de la matriz y en las diferentes composiciones.

[0117] En general, partículas que contienen lípidos de esta invención se administran en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad de las partículas realmente administrada será determinada típicamente por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la severidad de los síntomas del paciente, y similares.

[0118] Las dosis para uso humano pueden variar de acuerdo a otros compuestos incluidos. En vista de la duración del tratamiento, la dosis puede variar de <50 µg a 1 mg o más por día. Para formulaciones mejor toleradas que contienen una mezcla de 20% KGI y 80% BBE no causan efectos secundarios cuando se administran en dosis de 50 µg a ratones de 18 g, por lo tanto, dosis muy altas se pueden utilizar si es lo que se requiere.

#### **Kit de partes**

[0119] La invención por lo tanto también se refiere a un kit de partes que comprende al menos dos partes, en el que

una parte comprende partículas que contienen lípidos que comprenden al menos una fracción de saponina, que es hidrófoba que tiene un efecto letal sobre las células cancerosas; y la otra parte comprende partículas que contienen lípidos que comprenden al menos una fracción de saponina, que es hidrófilo, estimulando y modulando la respuesta inmune tales como la producción de anticuerpos y la inmunidad mediada por células.

**[0120]** La parte que comprende partículas que contienen lípidos que contienen al menos una fracción de saponina que es hidrófoba también puede contener partículas que tienen además al menos una fracción de saponina, que es hidrófila.

**[0121]** Las composiciones y kit de partes de acuerdo con la invención también pueden comprender al menos otro adyuvante que las fracciones de *Quillaja* Saponaria Molina. Estos adyuvantes se pueden mezclar con el iscom y/o complejos de iscom de matriz o estar integrados en los complejos o pueden darse en forma libre como tales.

### **Método de tratamiento**

**[0122]** A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un componente o grupo de componentes pero no la exclusión de cualquier otro componente o grupo de componentes.

### **Ejemplo 1**

Formulación de KGI 1 (QHC), KGI 2 (703-matriz ISCOM), KGI 3 (todas las fracciones Quill A incluyendo QHA por QHC) y BBE (QHA)

**[0123]** La estructura de la saponina de *Quillaja* se ilustra en la figura 1,1 mostrando que la fracción QHA carece de una cadena de alcyl presente en QHC. La partícula KGI 1 se basa en QHC en la zona derecha marcada en la figura 1,2. Esta fracción de saponina es más hidrófoba y más lítica de QHA siendo la saponina básica en BBE en el área derecha de la cromatografía invertida marcada en la figura 1,2.

**[0124]** KGI se puede formular a partir de fracciones de saponina de *Quillaja* definidos o mezclas de varias fracciones de saponina de *Quillaja*. Por lo tanto, KGI 1 está hecho de fracción de QHC, KGI 2 está hecho de una mezcla de QHA (7 partes) y QHC (3 partes) y KGI 3 es una mezcla de fracciones no separadas de *Quillaja*. También QHB se puede convertir en una partícula de matar cáncer de KGI. BBE está hecho de QHA. Las proporciones pueden modificarse para adaptar las propiedades deseadas de matar o menos propiedades citotóxicas para enfatizar las propiedades de diferenciación.

### **Resultados**

**[0125]** La formación de partículas KGI y BBE se describen en Materiales y Métodos más arriba y se basan en el trabajo para la formulación de ISCOM (Morein, Sundquist et al. 1984), y más tarde para ISCOMMATRIX Morein et al. 2007. La estructura ISCOM de tipo jaula de 30-40 nm de diámetro se visualizó por microscopía electrónica (EM) (Figura 1,3). Las fracciones que, después de la ultracentrifugación, que contiene estructuras ISCOM de tipo de jaula son observadas por EM que tiene un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 20 S (véase Materiales y Métodos)

### **Conclusión**

**[0126]** Las partículas con varios efectos farmacológicos, pero con la misma morfología se forman y fácilmente se prevén por EM y se definen por centrifugación en gradiente que se utilizan como se describe en los siguientes ejemplos. Estas partículas pueden ser utilizadas para modificar la respuesta inmune/propiedades de matar cáncer y como partícula de administración para diversas moléculas en el campo de la terapia del cáncer.

### **Ejemplo 2**

Efecto lítico sobre las células rojas de la sangre (RBC) y células nucleadas

**[0127]** Es bien conocido que la saponina tiene efecto lítico celular y por esta razón se ha probado como candidato para el tratamiento del cáncer (Wang, ZP 2005). El patrón de saponina de *Quillaja* después del fraccionamiento por HPLC se muestra en la Fig. 1,1. En la presente invención, QHC utilizado en formulaciones KGI 1, 2 y 3 partículas es muy lítico debido a la cadena de acilo graso (Fig. 2.1). En contraste, QHA utilizado en formulaciones BBE, partículas de KGI 2 y 3 carecen de ácido de cadena de acilo graso, por lo tanto, es prácticamente no lítico. Los glóbulos rojos se usan para medir los efectos líticos de las sustancias de su membrana celular causando un daño que permite que la hemoglobina se escape hacia fuera en el fluido de suspensión fácilmente determinado por espectrometría (véase Materiales y Métodos). El método es sensible y reproducible. El efecto lítico de las sustancias en las membranas celulares de las células nucleadas tiene que probarse por un método diferente. Hemos utilizado tinción con azul

tripán. Los KGI libres tienen propiedades de saponina y son líticos por la interacción con el colesterol en la membrana celular que resulta en poros hexagonales de 6 nm. El tinte entra en las células dañadas a través de estos poros en la membrana celular. Estos poros causarán instante lisis de células y muerte de las células nucleadas. Por lo tanto, una concentración lítica de saponina libre provoca una muerte celular instantánea en una cuestión de minutos, por ejemplo 10 minutos se ha usado para delinear el efecto lítico de otros mecanismos de muerte celular que requieren horas o días, por ejemplo apoptosis. En partículas de KGI, la saponina está fuertemente ligada al colesterol e impide que la saponina en KGI interactúe con el colesterol en la membrana celular previniendo la formación de poros y efectos líticos.

**[0128]** La célula cancerosa nucleada de U937 y las células neutrófilas normales a partir de sangre humana se expusieron a formas libres y partículas de KGI y BBE.

#### Resultados

**[0129]** Los resultados de los análisis hemolíticos se resumen en la Tabla 2.1. BBE libre, siendo la materia prima para las partículas de BBE, no causó efecto lítico en dosis de hasta 50 µg/ml similar a la dosis de QHA reportada por Rönnberg et al. (Ronnberg, Fekadu et al. 1995). La partícula BBE no lisa RBC a concentraciones de hasta 100 µg/ml.

**[0130]** QHC, la materia prima en KGI libre 1 y presente en la partícula KGI 1, lisó RBC a una concentración de 5 µg/ml. KGI 3 libre que contiene fracciones de saponina (QHA, B y C) lisó RBC a una concentración de 20 µg/ml. La partícula KGI 3 no provocó la lisis de RBC a una concentración de 100 µg/ml (Véase la Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Actividades citotóxicas y hemolíticas de diversas formas libres de saponina de *Quillaja* y formas particulares, es decir, partículas KGI y BBE

| Fracción de saponina                                                                 | Formulación/Forma física | Citotoxicidad LC <sub>50</sub> (m g/ml) medida mediante azul alamar |        | Actividad hemolítica (µg/ml) |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------|
|                                                                                      |                          | U937                                                                | DC     |                              |
| QHA                                                                                  | BBE                      | > 1920                                                              | > 1920 | >100                         |
|                                                                                      | BBE libre *              | 31,8                                                                | ND     | 50                           |
| QHC                                                                                  | KGI 1                    | 0,8                                                                 | 24,3   | 100                          |
|                                                                                      | KGI libre 1 **           | 3,291                                                               | ND     | 5                            |
| QH-A (7)+QH-C(3) en una partícula                                                    | KGI 2                    | 18,7                                                                | 826    |                              |
| Quill A no fraccionada                                                               | KGI 3                    | 14,1                                                                | 625    | 100                          |
|                                                                                      | *** gratuito KGI 3       | 12,4                                                                | ND     | 20                           |
| * Materia prima para BBE; ** Materia prima para KGI 1, *** Materia prima para KGI 3. |                          |                                                                     |        |                              |

**[0131]** En la Tabla 2.2 el efecto lítico de las células expuestas a las formulaciones KGI durante 10 minutos y posteriormente se tiñeron con azul de tripano se muestra. La concentración más alta utilizada para el tratamiento de células cancerosas ha sido 50 µg/ml y las células nucleadas no fueron lisadas o muertas durante este período de tiempo. En contraste, la forma libre lisó las células nucleadas siendo 17 µg/ml para las células neutrofilicas y 27 µg/ml para las células cancerosas U937. Las células nucleadas no murieron dentro de los 10 minutos ni siquiera después de una hora de exposición a las partículas KGI 1 (no mostradas).

**Tabla 2.2 efecto lítico de libre KGI 1 y partículas KGI 1 en células cancerosas de U937 en neutrófilos detectados por tinción con azul de tripano. Las células se incubaron con las formulaciones KGI durante 10 minutos.**

| Formulación | Células U937 (µg/ml en CL50) | Neutrófilos (µg/ml a CL50) |
|-------------|------------------------------|----------------------------|
| KGI 1 libre | 27                           | 17                         |
| KGI 1       | >50                          | >50                        |

5

## Discusión y conclusión

10

**[0132]** Es esencial que los compuestos utilizados para el tratamiento del cáncer matan las células cancerosas selectivamente sobre las células normales y que la eliminación de células cancerosas es eficiente en dosis bajas en vista del problema de conseguir altas concentraciones en el sitio diana *in vivo*. El efecto lítico es característico de saponina en forma libre y no un efecto tóxico celular preferido para matar el cáncer. Además, la forma libre es lipofílica e interactúa con la membrana celular en el sitio de administración, causando la destrucción celular local y una proporción de la saponina está atrapada en ese sitio. Las partículas KGI y BBE no lisan la membrana celular de los glóbulos rojos o células nucleadas en dosis "fisiológicas". Como cuestión de hecho, la dosis más alta examinada, es decir, 50 µg/ml no causó efectos tóxicos líticos o instantáneos, mientras que las formas no particuladas (libres) de la saponina de *Quillaja* causaron efecto lítico y tóxico celular en concentraciones considerablemente más bajas.

20

**[0133]** La forma libre de KGI lisa los glóbulos rojos y mata las células nucleadas dentro de 10 minutos en dosis comparativamente bajas. Como se muestra en el Ejemplo 7, KGI 1 mata las células cancerosas a una dosis fisiológica baja de 2 µg/ml o incluso menos siendo menor que las concentraciones líticas o de membrana perjudiciales de la forma saponina libre. Incluso altas dosis de 50 µg/ml de KGI 1 requirieron horas para matar las células cancerosas que subrayan fuertemente otro mecanismo implicado en la destrucción de células cancerosas que el efecto dañino de la membrana lítica. Se ha de tomar nota de que efecto lítico de células era similar para las células cancerosas y las células de neutrófilos normales. Por lo tanto, es una gran ventaja que las formas en partículas evaden la muerte lítica no discriminada de células normales y cancerosas. Además, el efecto lítico causa efectos secundarios locales y menos biodisponibilidad atrapando las cantidades sustanciales inyectadas de los compuestos en el sitio de inyección. Por lo tanto, es una característica innovadora que produce partículas de saponina de *Quillaja* para la terapia del cáncer. La forma de partículas es por lo tanto también un sistema de administración farmacológica.

25

## Ejemplo 3

35

KGI 1 mata selectivamente las células cancerosas

**[0134]** Este ejemplo demuestra que la partícula de KGI 1 mata selectivamente las células tumorales sobre las células normales medidas por el método de azul de Alamar. Una línea celular de monoblasto maligno (U937) fue seleccionada como célula tumoral para la comparación con una célula normal es decir, células dendríticas derivadas de monocitos (DCs) (véase Materiales y Métodos). Un componente de saponina activa en KGI 1 es QHC (KGI 1 libre) aislado de Quill A disponible comercialmente, que se origina del árbol *Quillaja* saponaria Molina. KGI libre, es decir, fracción QHC es altamente hidrofóbica en comparación con la fracción QHC es decir, BBE libre como se muestra en la Fig 3.1 (cromatograma HPLC de Quill A). El QHC difiere de QHA por una cadena de alcilo carente de QHA, lo que explica la mayor hidrofobicidad de QHC y su efecto lítico (Fig 3.2).

45

**[0135]** Las células tumorales: líneas celulares de monoblasto (THP-1, U937 y U-937-1) y las líneas celulares de mieloma (LP-1 y Jurkat) obtenidas del hospital académico Uppsala, se expusieron a KGI 1.

50

## Resultados

**[0136]** KGI 1, formulada como se describe en Materiales y Métodos, mata el tumor como se indica anteriormente y en la Tabla 3.1. Las cinco líneas celulares tumorales enumeradas murieron por KGI 1 a una concentración de CL50 que varía de 0,8-10 µg/ml (Tabla 3.1 y Fig 3.1), mientras que la CL50 de DCs normales es de 24,3 (Fig 3.2). Por lo tanto, se requiere una concentración 30 veces mayor de KGI 1 para matar las células normales.

55

Tabla 3.1

| Nombre de célula                | Dosis de saponina (µg/ml) en CL50 |        |             |               |       |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------|-------------|---------------|-------|
|                                 | Quil A                            | KGI 3  | KGI 1 libre | KGI 1         | BBE   |
| <u>Células cancerígenas</u>     |                                   |        |             |               |       |
| Jurkat                          | 0,488                             | ND     | 10          | 10            | ND    |
| THP-1                           | ND                                | ND     | 0,939       | 0,875         | ND    |
| U937                            | 12,426                            | 14,073 | 3,219       | 3,068         | >1920 |
| U937-1                          | ND                                | ND     | 1,761       | 1,601         | ND    |
| LP-1                            | ND                                | ND     | 1,897       | 1,998         | ND    |
| <u>Células humanas normales</u> |                                   |        |             |               |       |
| DC                              | ND                                | 625    | ND          | 24,322        | >1920 |
| Neutrófilos (lisis aguda)       | ND                                | ND     | 28,551      | >50 (5 horas) | ND    |

#### Discusión y conclusión

**[0137]** Los inventores han identificado una fracción de saponina de Quillaja que en la forma de partículas, KGI 1, mata selectivamente las células tumorales. En este caso la célula de monoblasto U937 murió a una concentración que es 30 veces menor que una concentración necesaria para matar a la célula normal. El efecto de alta matanza puede ser localizada a una fracción hidrófoba de un diagrama de fase inversa de saponina de Quillaja. En contraste, la fracción más hidrófila QHA (Fig 1,1 y 1,2) no está matando el cáncer o las células normales a dosis pertinentes.

**[0138]** Por lo tanto, KGI 1 es un candidato para la terapia del cáncer como se fundamentará en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 4

BBE no es tóxico para las células nucleadas

**[0139]** La fracción comparativamente hidrófila de QHA (BBE libre) a partir de un diagrama de fase inversa (Fig 1,1 y 1,2) se incorporó en las partículas BBE y se ensayaron para determinar su efecto letal sobre el cáncer o las células normales y se encontró no citotóxica (Figs, 4,1 y 4.2).

#### Resultados

**[0140]** Partículas BBE no mataron el cáncer (Fig. 4.1) o células normales (Fig. 4.2) a dosis pertinentes, es decir, a concentraciones ensayadas hasta 1920 µg/ml.

#### Discusión y conclusión

**[0141]** Este ejemplo demuestra que una partícula BBE está virtualmente libre de citotoxicidad es decir, bien aceptada por células tanto normales como tumorales. La partícula BBE no mata el tumor o las células normales en cualquier concentración ensayada hasta 1920 µg/ml (Fig 4.1 y 4.2). Una diferencia es que la saponina en BBE carece de una cadena alifática que también explica el bajo efecto lítico de la forma libre de la sustancia activa QHA (véase el Ejemplo 2, Tablas 2.1 y 2.2). La partícula BBE será útil para moderar o modular la actividad de partícula KGI en vista de su efecto modulador, por ejemplo, mediante la estimulación de la producción de citoquinas.

#### Ejemplo 5

BBE bloquea el efecto de matar células de KGI

**[0142]** Este ejemplo muestra que BBE bloquea la matanza de KGI 1. La diferencia más prominente es que la saponina en KGI 1 tiene una cadena de alcilo mientras que la saponina en BBE carece de esa cadena (para más detalles véase ejemplos 1, 2 y 4)

#### Resultados

**[0143]** Una concentración constante de KGI 1 de 77 µg/ml se incubó con una concentración creciente de BBE y aplicada sobre las células cancerosas U937. El efecto tóxico celular de KGI 1 fue bloqueado en una proporción de 10:1 (KGI 1: BBE). Es probable que el efecto de bloqueo sea mediado por receptores como lo revela la curva de la Fig. 5.1.

**[0144]** El efecto de bloqueo es eficaz en vista de la concentración constante alta KGI 1 de 77 µg/ml utilizado, teniendo en cuenta que se trata de CL50 en células U937 es sólo 0,8 µg/ml.

## Discusión y conclusión

**[0145]** Los inventores han identificado una sustancia en forma de partícula KGI 1 que mata selectivamente las células tumorales. Se ha identificado otra sustancia formulada como partícula BBE que bloquea el efecto de matar por KGI 1, tanto en células tumorales como en células normales (no mostradas), es decir, se crea un sistema de matar un tumor, que puede ser la toxicidad con eficacia moderada si debe ocurrir. Cabe señalar que las sustancias activas QHC y QHA en este ejemplo están presentes en diferentes partículas, a saber KGI 1 y BBE. Es probable que el receptor de bloqueo de promoción de la muerte de las células cancerosas es diferente del receptor de la promoción de la activación y diferenciación de las células normales y cancerosas.

## Ejemplo 6

**[0146]** KGI y BBE son sistemas de administración, el efecto de la presentación de las sustancias activas en una o dos partículas diferentes se analiza en células normales y cancerosas.

**[0147]** El ejemplo 5 muestra que la sustancia activa QHA en una partícula separada de BBE bloquea el efecto de célula tóxica de KGI 1 que contiene otro saponina activa, es decir, QHC. Este efecto de bloqueo es probablemente debido al bloqueo a través de uno o más receptores.

**[0148]** KGI 2 alberga las dos sustancias activas de saponina QHC, la sustancia activa de KGI 1, y QHA siendo la saponina activa de BBE. Este Ejemplo ilustra que estos dos componentes en una y la misma partícula combinan y moderan los efectos de cada uno de los componentes. El ejemplo también muestra que los mismos componentes co-administrados en partículas separadas moderan y modulan la respuesta de las células expuestas.

Partículas de tipo KGI 2 tenían diferentes proporciones de QHA/QHC en las proporciones 7:3, 7,5: 2,5 o 9,5:0,5 preparado como se describe para KGI 2 (703) con diferentes proporciones del material de partida. La supervivencia celular se midió mediante AlamarBlue (véase Materiales y Métodos).

**[0149]** En el experimento ilustrado en la Fig 6.2, el KGI 2 (703) se incubó con células cancerígenas U937 durante 48 horas y de forma similar con DC inmaduras humanas (Fig 6.3).

**[0150]** Las células normales de los mamíferos tienen diversas tareas para sostener la vida animal o humana. Una población DC proviene de monocitos. En este ejemplo, las células sanguíneas periféricas humanas han sido tratadas con IL-4 y GMC-SF para obtener una población DC inmadura derivada de monocitos obtenida a partir de 3H biomédica (Uppsala, Suecia). Para obtener información detallada utilizada en este ejemplo, consulte Materiales y Métodos. Este ejemplo demuestra que varias formulaciones KGI y BBE activan DC humanas inmaduras para madurar y expresar un marcador DC CD86 que es una molécula de DC activadas que se comunican a linfocitos a la diferenciación y activación a células efectoras.

**[0151]** Las diferentes formulaciones de KGI y BBE son KGI 1 que contiene solamente KGI 1; KGI 2 preparado a partir de 70% de QHA (materia prima de BBE) y 30% de QHC (materia prima para KGI 1) en una misma partícula; KGI 3 contiene una mezcla de fracciones de saponina de Quillaja en forma de Quill A; sólo la BBE y la formulación BBE + KGI 1 está compuesta de 80% de partículas BBE y de partículas KGI 1 al 20%, es decir, cada compuesto en partículas separadas. Los estudios iniciales han demostrado que la concentración de tratamiento debe ser fluido de cultivo celular 1 g/ml para KGI 1, KGI 2 y KGI 3, mientras que para BBE y BBE + KGI 1 la concentración debe utilizarse a 10 g/ml. Para más detalles, véase Materiales y Métodos.

## Resultados

**[0152]** Las formulaciones de tipo KGI 2, con las diferentes proporciones de QHA: fracciones QHC que varían desde 7:3, 7, 5:2,5 incubadas durante 2 días, mató las células cancerosas U937 a las concentraciones de 20 a 100µg/ml. La dilución de la fracción QHC activa con la fracción QHA de 0,5 a 9,5 eliminó completamente la actividad citotóxica dentro del tiempo de incubación de 48 horas (Fig 6.1). Estos resultados deben compararse con los dados en el Ejemplo 5.

**[0153]** Un segundo experimento demuestra que KGI 2, combinando fracciones de saponina QHA y QHC, la partícula en la proporción QHA:QHC 7:3 mata la célula tumoral U 937 en CL50 de 18,7 g/ml (Fig 6.2), que es 23 veces mayor

que la CL50 de KGI 1. las DCs humanas normales requeridas a una concentración 44 veces más alta de KGI 2 para la muerte celular de las células cancerosas U937, es decir, LC 50 de 826 µg/ml (Fig 6.3).

**[0154]** En la Tabla 3.1, el efecto de matar las células cancerosas por diferentes partículas KGI en varias células cancerosas, medidas por el método AlamarBlue o azul Tripán para las células neutrofilicas humanas normales. En general, se puede concluir que varias células cancerosas diferentes son sensibles a las formulaciones KGI e incluso más sensibles que las células U937. Las células U937 en esta solicitud se utilizaron como modelo para más en estudios fundamentales.

**[0155]** Una actividad activadora y diferenciadora se muestra en la Fig 6.4. KGI 2 en la dosis fisiológica baja de 1µg/ml, indicó la proporción más alta de células positivas CD86 (67,3%) que indica un efecto sinérgico entre KGI 1 y componentes BBE en una y la misma partícula es decir, la partícula KGI 2. También muestra que las partículas KGI y BBE son partículas de suministro de soporte, es decir, KGI 2 ofrece 2 componentes.

BBE indujo la misma proporción de células positivas CD 86 como LPS; mientras que la formulación BBE + KGI 1 indujo 65,8%. Las dos últimas formulaciones requieren una dosis mayor de 10 veces, es decir, 10 g/ml de KGI 2.

#### Discusión y conclusión

**[0156]** Las formulaciones KGI 1, KGI 2 y KGI 3 son sistemas de suministro que combinan dos componentes y potencialmente más diferentes con diferentes propiedades. En este ejemplo, se combinaron dos propiedades diferentes resultando en un efecto completamente diferente de la muerte del cáncer. Simplemente, la mezcla de los dos compuestos diferentes, es decir KGI 1 y BBE confinados a diferentes entidades (partículas) como se describe en el Ejemplo 4, moderan la actividad mediante bloqueo. La combinación de las dos sustancias en una misma partícula KGI (KGI2) redujo la toxicidad en una forma de dilución, es decir, reducción de la densidad de los ligandos KGI 1 puesto que el bloqueo no se puede lograr con diferentes componentes en una misma partícula. Los efectos mencionados se registraron tanto en cáncer como en células normales. Aunque la toxicidad de KGI 2 para una célula cancerosa se redujo en comparación con la de la partícula KGI 1 el margen de efecto tóxico en una célula humana normal (DC) a una célula cancerosa (U937) aumentó en 30 veces (KGI 1) a 40 veces (KGI 2). Es concebible que el efecto de dilución sea causado por una menor afección a medida que se reduce el número de interacciones ligando-receptor que inducen la muerte celular. El efecto citotóxico es muy probablemente ejercido por una diferente constelación de receptor de ligando que el que media el efecto de bloqueo. En la partícula KGI 2 u otras partículas similares, es posible combinar la capacidad de modulación de BBE y el efecto letal de KGI 1 mediante el aumento de la CL50 de 0,8 g/m de KGI 1 a 18,7 g/ml en KGI 2 y aún así mantener o aumentar un alto margen entre la toxicidad de las células cancerosas y células normales, por ejemplo una diferencia de 40 veces. Es probable que tenga un comportamiento clínico in vivo. El efecto de eliminación de células cancerosas de KGI 1 se reduce linealmente por el efecto de bloqueo de BBE, pero la capacidad de diferenciación ejercida por ambas partículas no se cambia sustancialmente como se puede leer de los experimentos realizados hasta ahora. La flexibilidad de estos hallazgos hace posible adaptar la toxicidad y la activación-diferenciación de las células cancerosas al comportamiento celular normalizado con un final programado con apoptosis. Es de notar que ambas formulaciones, es decir, dos sustancias en la misma partícula o las dos sustancias en partículas separadas, tienen probablemente un valor clínico. Por ejemplo, KGI 1 mata las células cancerosas a una concentración demasiado baja que puede obstaculizar otras propiedades tales como diferenciación, activación de células cancerosas que terminan con apoptosis de muerte celular programada, que pueden tener efectos sobre los efectos de espectador, es decir, efectos en células adyacentes que no se exponen directamente (véase ejemplo 7). Por ejemplo, está bien establecido que en el sistema inmunitario, los DC liberados liberan componentes que estimulan en cruzado DCs adyacentes.

La apoptosis (véase Ejemplo 7) es menos dramática para el individuo que la muerte celular por necrosis, evitando así los efectos tóxicos de las células que causan enfermedad en los individuos tratados. La apoptosis de las células cancerosas es, por lo tanto, atractiva en la terapia del cáncer. En este contexto, se puede anticipar que las células cancerosas muertas liberan componentes inmunogénicos que pueden iniciar la protección inmunitaria bajo la influencia de componentes activos que mejoran el sistema inmunitario, como los que tienen partículas que contienen KGI y BBE. Por lo tanto, la partícula KGI es un sistema de suministro que abre la posibilidad de adaptar la muerte celular o de integrar otras sustancias con diversas actividades contra el cáncer. Tales sustancias deben actuar preferentemente sobre otros principios como, por ejemplo, las células que matan taxol, sobre el daño al citoesqueleto o la vitamina A o D, promoviendo la diferenciación a través de diferentes mecanismos que las partículas KGI o BBE. La partícula KGI demuestra una capacidad de suministro que no está limitada a los componentes utilizados en este ejemplo. En conclusión, los diversos KGI o KGI en combinación con otros compuestos, por ejemplo, BBE en forma libre o en forma de partículas, eliminan selectivamente células cancerosas sobre células normales (Tabla 3.1).

**[0157]** La formulación KGI 1 activa - estimula la célula cancerosa U937 para producir IL8 y apoptosis pero no a la muerte celular caracterizada por necrosis (véase el Ejemplo 7). Otras formulaciones de KGI como KGI 2 y 3 requieren una concentración mucho mayor para matar células normales y de cáncer y todavía hay un margen de seguridad de 30 a 40 veces para las células normales (véanse los ejemplos 5 y 6). En este ejemplo se ilustra que

una elevada proporción de DC inmaduros normales se estimula a DCs maduras, expresando CD86. Se ha encontrado que mediante la combinación del compuesto activo QHA o BBE con QHC siendo el componente de saponina en KGI 1 en una y la misma partícula se grabó un efecto sinérgico, es decir, la baja dosis de 1 mg/ml de KGI 2 indujo la mayor proporción de células positivas CD86. BBE que requiere 10 µg/ml se utilizó a una concentración de 0,8 g de fluido de cultivo de células del compuesto activo en combinación con 0,2 mg/ml del compuesto activo KGI 1 en la formulación KGI 2. Ambos componentes activos eran considerablemente más bajos que los requeridos por cada uno de los componentes utilizados por sus propios medios. Es decir, la concentración de compuesto BBE se redujo más de diez veces y la del compuesto KGI activo se redujo cinco veces en la partícula KGI2 proporcionando un efecto aumentado. El KGI 3 que contiene un número de fracción de saponina Quillaja no indujo en este ejemplo la expresión de CD86, más bien la inhibía. Se requieren más experimentos para confirmar si existe un efecto inhibidor de KGI3 con respecto a la expresión de CD86.

**[0158]** En conclusión, se muestra un efecto sinérgico inesperado medido por maduración de DCs humanos cuando dos componentes en la partícula KGI 2 interactúan con células que enfatizan perspectivas valiosas para las partículas KGI y BBE como sistemas portadores dirigidos a células a través de receptores. Ya que se propone que el efecto de matar el cáncer por partículas KGI y/o BBE actúe a través de la activación y la diferenciación, que debería ser posible analizar en las células normales. Cabe señalar que las células cancerosas son muy diferentes y un sistema de eliminación de células cancerosas donde las propiedades de orientación pueden ser cambiadas da lugar a nuevas posibilidades para el tratamiento del cáncer.

### Ejemplo 7

Análisis del efecto KGI 1 contra el cáncer mediante la aplicación de diferentes sistemas de detección

**[0159]** Saponina Quillaja en la forma particulada de KGI mata las células cancerosas en concentraciones más bajas de 30 a 40 veces que las células normales (Ejemplo 3). En este ejemplo, la muerte de células cancerosas se ha analizado por varios métodos, incluyendo la tinción con azul de tripán, la inhibición metabólica enzimática por el método de AlamarBlue, los cambios necróticos visualizados por tinción con yoduro de propidio y por apoptosis mediante tinción con Anexina V, como se describe en detalle en Materiales y Métodos. La tinción con azul tripán de células en relación con los tratamientos es informativa para establecer el número de células y la viabilidad se determina hasta 9 días (Figs 7.1, 7.2). Baja dosis de KGI 1 (2 µg/ml) causó muerte de cáncer celular después de un período más largo, mientras que una dosis alta (25 mg/ml) muerta dentro de un período más corto (Fig. 7.3) y desencadena la apoptosis más rápida (Fig. 7.6). En este ejemplo, la muerte celular se mide por el método del azul de tripán. Se correlacionó con la muerte celular programada, es decir, la apoptosis después de la salida de las células del ciclo celular. El ciclo celular es la base para la replicación celular, y es significativo para las células cancerosas que permanecen en el ciclo celular para una replicación continua. Una salida del ciclo significa que las células pueden iniciar la activación hacia la producción en este caso la producción de citoquinas (Ejemplo 10) y finalmente progresar a una muerte celular programada como se demuestra en este ejemplo. Hemos utilizado un ensayo de quinasa de timidina (TK) para indicar si las células tratadas están en la fase de replicación, es decir, en el ciclo celular o se escaparon del ciclo (Ejemplo 9) y entraron en la vía que conduce a la capacidad de producción y finalmente a la apoptosis.

**[0160]** La capacidad de KGI 1 para matar la célula cancerosa U937 se analiza mediante el método de tinción con azul tripano (véase Materiales y Métodos) en los siguientes experimentos:

Las células U937 se sembraron en placa de microtitulación con 2 g/ml KGI 1. En una serie de cultivos, las células se expusieron a KGI 1 de forma continua durante 9 días (Fig 7.1). El número de células se ajustó a  $1 \times 10^6$ /ml cada 3 días en medio fresco que contiene la misma concentración de KGI 1. En cada ocasión se calculó el número acumulado de células.

**[0161]** En un segundo conjunto de cultivos, el tratamiento de KGI se terminó después de 3 días por la sustitución del medio sin KGI 1 (Fig 7.2). El número de células se ajustó a  $1 \times 10^6$ /ml en cada ocasión en que se cambió el medio. Se calculó el número acumulado de células.

**[0162]** Las células cancerosas de U937 fueron expuestas a la dosis alta de 25 g/ml de las formas libres o de partículas de KGI 1 y se tomaron muestras como se indica en la Fig 7.3. Las células se tiñeron con azul de tripán y la viabilidad se contó mediante microscopía. La viabilidad celular se expresa como porcentaje de las células viables del control celular.

**[0163]** Para comparar la citotoxicidad, las células cancerosas U937 fueron expuestas a la dosis fisiológica baja de 2 mg/ml de formas libres o de partículas de KGI. 1 como se indica en la Fig 7.4. Las células se tiñeron con azul Tripán. La viabilidad se expresa como porcentaje de las células viables del control celular.

**[0164]** Las células cancerosas de U937 se expusieron durante 12 días a las dosis bajas de 0,5 g/ml o a 2 g/ml de KGI 1 como se indica en la Fig. 7.5. El número de células se contó después de la tinción por el método de azul Tripán.

**[0165]** La capacidad de KGI 1 particulado para inducir la apoptosis se analizó en células cancerosas U937. Las células fueron expuestas durante 120 horas a KGI 1 a las concentraciones de 2 mg/ml o a 25 µg/ml (Fig. 7.6). El número de células positivas a la anexina V (Fig. 7.6) y células necróticas de yoduro de propidio (PI) (Fig. 7.7) se determinaron simultáneamente por FACS (véase Materiales y Métodos). Las células cancerosas U937 fueron expuestas durante 120 horas a KGI 1 a las concentraciones de 2 mg/ml (M2) hasta 50 µg/ml (M50).

**[0166]** En la Fig 7.8, se expusieron células U937 durante 120 horas a KGI 1 a concentraciones de 2 mg/ml hasta 50 mg/ml. Las células se muestrearon y se tiñeron con yoduro de propidio y Anexina V como se indica en la figura. Las proporciones de células afectadas fueron determinadas por FACS. Los detalles se dan en Materiales y Métodos.

## Resultados

**[0167]** La viabilidad de las células cancerosas U937 después de un tratamiento prolongado con KGI 1 se muestra en la Fig. 7.1 y 7.2. Un tratamiento interrumpido de células cancerosas con una dosis fisiológica baja de 2 mg/ml de KGI 1 era tan eficiente para la inhibición de la proliferación y matar a las células cancerosas como el tratamiento continuo. El número de células se había disminuido a virtualmente ninguna célula viable después de 9 días de incubación. El número de células no tratadas se aumentó de 1 millón/ml a 3 millones/ml durante el cultivo durante 3 días. El número de células tratadas se reduce a menos de  $0,5 \times 10^6$ /ml después de 3 días de cultivo y se disminuyó aún más durante los 9 días de cultivo (Fig. 7.1 y 7.2).

**[0168]** La alta dosis de 25 g/ml de la forma libre de KGI 1, es decir, fracción QHC de Quill A mató rápidamente las células es decir, dentro de 3 horas, mientras que la concentración de la partícula KGI 1 requiere más tiempo, es decir, 24 horas para matar una alta proporción de las células cancerosas.

**[0169]** La dosis fisiológica baja 2 µg/ml de la forma libre de KGI 1, es decir, fracción QHC de Quill A no mató a las células dentro de 60 horas, mientras que la concentración de la partícula KGI 1 comenzó a matar a las células cancerosas después de 24 horas de cultivo y continuó durante el período de cultivo experimental de 60 horas, cuando la viabilidad celular había disminuido al 20%. A esta concentración, la forma libre no particulada falló durante el período de cultivo de 60 horas para reducir el número de células cancerosas. Esta concentración no es lítica celular.

**[0170]** La muy baja dosis de 0,5 g/ml de partículas KGI 1 redujo el número de células en comparación con las células no tratadas, mientras que la dosis fisiológica de 2 g/ml de partícula KGI 1 mató a todas las células cancerosas dentro de los 12 días de cultivo (Fig. 7.5).

**[0171]** La inducción de la muerte celular programada (apoptótica) se muestra en la Fig. 7.6. La concentración de 2 µg/ml de KGI provocó población incrementada de células U937 apoptóticas con un nivel de pico después de 24 horas de exposición. La concentración mayor, es decir, 25 g/ml de KGI aumentó aún más la proporción de células apoptóticas con niveles de pico después de la exposición durante 12 y 24 horas.

**[0172]** La inducción de células necróticas (Fig.7.7). En contraste con el efecto de las partículas KGI 1 en la inducción de la apoptosis no hubo efecto sobre la muerte celular necrótica. Esto es, no había diferencia en la proporción de células necróticas entre las células tratadas con diversas dosis del KGI 1 en partículas y las células de control no expuestas a KGI 1.

**[0173]** Fig. 7.8 muestra las células cancerosas U937 tratadas con KGI 1 a lo largo del tiempo manchan tanto para yoduro de propidio (PI) como Anexina V durante el periodo experimental durante 120 horas a las concentraciones de 2 mg/ml hasta 50 mg/ml. El aumento de la concentración y con el tiempo indujo un aumento de la población de células teñidas para efectos tanto necróticos como apoptóticos. Los controles mostraron menores proporciones de células teñidas tanto para apoptosis como para necrosis. Inicialmente, las células tratadas con KGI 1 se tiñeron principalmente y sólo para la anexina V, pero con el tiempo las células se tornaron necróticas y se tiñeron de forma doble.

## Discusiones y conclusiones

**[0174]** Una dosis baja (2 g/ml) de tratamiento KGI 1 de células U937 reduce drásticamente el número de células después de 3 a 6 días. Después de 12 días, prácticamente no quedan células cancerosas viables. Una alta dosis de KGI (25 g/ml) mata todas las células cancerosas dentro de 36 horas. En el ejemplo 3, hemos demostrado que las células cancerosas U937 son 30 a 40 veces más sensibles que las células normales. Una vez que se induce la muerte de las células cancerosas (véase Fig. 7.2 y 8.1), no hay retorno ya que la eliminación del KGI 1 del cultivo no detiene el avance a la muerte celular (véase también el ejemplo 4). Las células normales tienen un destino de muerte programada (apoptosis) que no causa síntomas adversos. En este ejemplo, podríamos demostrar que la apoptosis prominente fue inducida por KGI 1. La proporción de células apoptóticas se aumentó hasta 24 horas de exposición. Una dosis baja de 2 mg/ml de KGI 1 provocó la apoptosis más prominente después de la incubación durante 24 horas.

**[0175]** Con el tiempo, la proporción de células positivas a la anexina V se disminuye y la proporción de células que tiñen tanto para la anexina V como para PI se aumentó. El tratamiento con KGI 1 provocó una población de células doblemente positiva más grande que los cultivos no tratados. La población de células doblemente teñidas proviene de células necróticas o apoptóticas. Inicialmente, sólo había una proporción baja de células PI positivas iguales en las poblaciones de células tratadas y no tratadas. Por lo tanto, es probable que la alta proporción de células dobles positivas después del tratamiento con KGI se origine de una población inicialmente apoptótica.

**[0176]** La actividad TK cesada después de la exposición a KGI 1 (Ejemplo 9) coincide con el sentido de que las células cancerosas U937 inician la producción de la citoquina IL-8. La producción de IL-8 se usó como un indicador para la activación de las células cancerosas a una fase de producción provocada por KGI 1 como se muestra en el ejemplo 10. El efecto estimulador está próximo a la concentración en la que KGI 1 está matando las células cancerosas. Un escenario innovador e interesante es que el efecto estimulador lleva a las células tratadas con KGI 1 fuera del ciclo celular hacia una fase de producción hasta el destino inevitable de las células productoras normales a la muerte apoptótica final programada. Las formulaciones de KGI nunca han sido capaces de estimular la proliferación celular. Un proceso de eliminación de células cancerosas tiene una fuerte ventaja sobre la eliminación de células cancerosas por citostática o irradiación sin síntomas o al menos los efectos secundarios se minimizan.

### Ejemplo 8

**[0177]** KGI 1 causa la muerte de la célula de cáncer que no permite que las células vuelvan a drogas de replicación incontrolada usadas para el tratamiento del cáncer pueden tener un efecto bueno inicial, pero después de un tratamiento continuo el efecto de eliminación de células cancerosas puede revertir y las células comienzan una replicación incontrolada. Por lo tanto, es esencial que las células cancerosas tratadas no vuelvan a una proliferación celular incontrolada. El Ejemplo 7 muestra que KGI 1 mata células cancerosas incluyendo un mecanismo de apoptosis. Este ejemplo demuestra que después de un cultivo prolongado de las células cancerosas U937 tratadas con KGI 1, las células no vuelven a la replicación, más significativamente, incluso después de un tratamiento interrumpido con una dosis fisiológica baja.

**[0178]** Las células U937 fueron cultivadas con 0,5 g/ml o con 2 mg/ml de partículas KGI 1 durante un período de 12 días y tasas de supervivencia celular se compararon con la de las células no tratadas cultivadas bajo las mismas condiciones de tinción con azul tripán como se ha descrito en Materiales y Métodos.

**[0179]** En el siguiente experimento (Fig. 8.2), el tratamiento de las células U937 sincronizadas con una concentración de 2 g/ml de KGI 1 se interrumpió después del cultivo durante 72 horas mediante la sustitución del medio que contiene KGI 1 con medio fresco sin KGI 1. Cada tres días, el medio se cambió para promover el crecimiento celular. Después del cultivo durante 12 días, se contó el número de células viables después de tinción con azul Tripán.

### Resultados

**[0180]** El número de células cancerosas de U937 continuamente expuesto a KGI 1 a una concentración de 2 mg/ml primero se aumentó y luego se disminuyó de manera constante a partir de un punto de tiempo de entre 1 y 3 días. Al final del período experimental de 12 días, se registró menos del 10% de células vivas (Fig. 8.1). Después del tratamiento con 0,5 g/ml de KGI 1 hubo un aumento inicial del número de células seguido por una reducción a la mitad desde el día 3 después del punto de partida y luego el número de células fue significativamente menor que la del no tratado. Las células de control alcanzaron un número de células tres veces desde el principio. Así, después del tratamiento de las células con KGI 1 después de un período inicial de replicación, el número de células viables disminuyó después con las bajas concentraciones fisiológicas de KGI 1.

**[0181]** Fig. 8.2. Muestra que KGI 1 inhibe la proliferación y mata la célula cancerosa U937, y las células no vuelven a la proliferación durante los 12 días de cultivo incluso después de la eliminación de KGI 1 en el día 3.

### Discusión y conclusión

**[0182]** Ejemplo 3 presenta y discute el efecto de matar el cáncer ejercido por KGI 1. En este ejemplo, podemos sacar la conclusión de que las células tratadas con una dosis baja y fisiológica de 2 g/ml KGI 1, incluso después del tratamiento interrumpido, no volverá a proliferación celular.

**[0183]** El tratamiento con 0,5 µg/ml de KGI 1 redujo el número de células significativamente en comparación con el de las células de control no tratadas. Después de un período inicial de replicación, el número de células viables se disminuyó. Es probable que el recuento de células viables en los cultivos tratados con la concentración más baja (0,5 g/ml) de KGI 1 células indique que sobreviven en la ausencia de replicación.

**[0184]** En conclusión, las células cancerosas U937 expuestas a KGI 1 a baja concentración fisiológica no se convierten en replicación no controlada, pero el número de células se deteriora constantemente.

**Ejemplo 9**

Las células cancerosas tratadas con KGI 1 salen del ciclo celular

**[0185]** El Ejemplo 7 demuestra que KGI 1 mata células cancerosas incluyendo un proceso de apoptosis, y el ejemplo 8 muestra que la muerte de células cancerosas es irreversible. El Ejemplo 10 muestra que KGI 1 guía las células U937 para entrar en una fase de producción sin añadir un agente activador o diferenciador de células como el forbol-12-mirrestato-13-acetato (PMA) como se requiere para otros agentes (Baldrige, Cluff et al., 2002). El ciclo celular gobierna la replicación celular (Fig. 9.1). En la fase S, al principio del ciclo, se construye el ADN de las células hijas. Uno de los bloques de construcción de ADN es el nucleótido de timidina. La timidina requiere la enzima quinasa de timidina (TK) para su fosforilación. Por lo tanto, esta enzima tiene que preceder a la fase S que está disponible. Aquí se utiliza la actividad TK para explorar si KGI 1 influye en el ciclo celular de las células U937 y si las células tratadas con KGI 1 permanecen o salen del ciclo. La persistencia de las células tratadas con KGI 1 en el ciclo celular se analiza en este ejemplo detectando la actividad de TK en el tiempo, correlacionando la actividad de TK con la inhibición del metabolismo celular de cáncer (registrada mediante la prueba de AlamarBlue) eliminando (medido por la tinción de exclusión de tripán azul) y en la discusión con apoptosis. El metabolismo celular, la replicación y la actividad TK de las células no tratadas se utilizaron para registrar las células cancerosas que quedaban en el ciclo.

**[0186]** Se sembraron un millón/ml células U937 en placa de microtitulación para los experimentos llevados a cabo en este ejemplo. El intento de sincronizar las células U937 en el ciclo celular se hizo mediante la privación de las células durante 22 horas mediante la reducción de la concentración de suero fetal de ternera en el medio de cultivo celular de 10% a 0,5% como se detalla en Materiales y Métodos. Se midió la actividad de TK y las comparaciones se hicieron entre las células tratadas con partículas KGI 1 a las concentraciones de células de 2 µg/ml o 25 µg/ml y no tratadas. Las mediciones se realizaron a intervalos de hasta 5 días como se describe en las figuras 9.2 y 9.3 y los efectos se detallan en los resultados. En la Fig 9.4 se comparó la reducción de la actividad de TK, medida en el lisado celular, después del tratamiento de las células U937 con KGI 1 en partículas con las mismas concentraciones de KGI 1. Las muestras se ensayaron diariamente en lisado celular 120 horas después del tratamiento de 10<sup>6</sup>/ml de las células tratadas con 2 µg/ml (M2), 10 µg/ml (M10), 25 µg/ml (M25) 50 µg/ml (M50). En la Fig 9.5 se midió la actividad de TK en el fluido de cultivo celular después del mismo tratamiento con KGI 1 libre y en partículas como se muestra en la Fig 9.4.

**[0187]** En la Fig. 9.6. la actividad TK se analizó en las células cancerosas U937 sincronizadas expuestas a 2 µg/ml de KGI 1 para 0, 2, 8, 18 y 24 horas. Los controles no tratados se muestrearon a 0, 8 y 24 horas.

**[0188]** Fig 9.7. Células U937 sincronizadas se expusieron a 2 µg/ml de KGI 1 para 2, 8, 18 y 24 horas. Los controles se muestrearon a las 8 y 24 horas. Las células viables se contaron después de tinción con azul Tripán.

**[0189]** Fig. 9.8. La inhibición de las células metabólicas (azul alamar) y muerte celular (azul de tripano) se midieron en células U937 sincronizadas después del tratamiento durante 24 horas con 0,5 µg/ml o 2 mg/ml de partículas KGI 1 o KGI libre.

**Resultados**

**[0190]** La actividad de los TK de las células tratadas se redujo en comparación con la de los controles no tratados durante los 5 días de cultivo. La reducción de la actividad TK después del tratamiento con la dosis alta de 25 mg/ml, de KGI 1 es prominente después de 24 horas y para la dosis baja de 2 µg/ml de KGI 1 después de 48 horas (Fig 9.2). La actividad TK de las células tratadas también se registra como porcentaje de las células no tratadas Fig. 9.3. Después de 3 días no se detectó actividad TK de las células tratadas con 25 mg/ml de KGI 1. El tratamiento de células con una baja dosis de 2 mg/ml de KGI 1 redujo la actividad TK a 10% después de 5 días.

**[0191]** Fig 9.4 muestra que una dosis fisiológica baja de 2 mg/ml de KGI 1 provoca una reducción importante de la actividad de TK después de la exposición de las células cancerosas durante 48 horas, pero siendo más prominente después de 72 horas de exposición. La reducción de la actividad de TK es menos prominente después del tratamiento con conexión KGI 1. La reducción de la actividad TK después del tratamiento con las altas dosis de 25 o 50 µg/ml de KGI 1 es prominente anteriormente es decir, después de la exposición durante 24 horas. Las células tratadas con las dosis altas de KGI 1 libre es decir, 25 y 50 µg/ml abolieron toda la actividad de TK detectable en todos los puntos de tiempo durante los 6 días de cultivo, pero la actividad TK, en cambio, se detectó en el medio de cultivo (Fig. 9.5) indicando daños en la membrana celular. Estas concentraciones de KGI libre tienen efecto lítico (Ejemplo 2, Tabla 2.1). En contraste, las partículas KGI 1 no liberaron cantidades detectables de TK al fluido de cultivo celular.

**[0192]** Fig 9.6 muestra que KGI 1 a una dosis fisiológica baja de 2 µg/ml reduce la actividad de TK de las células cancerosas U937 sincronizadas grabadas en muestras de células tratadas durante 18 y 24 horas es decir, antes de entrar en la fase de replicación en el segundo ciclo celular. "Ninguna inhibición de la actividad de TK se realizó con la dosis baja durante las primeras 8 horas.

**[0193]** Fig. 9.7 muestra que una dosis baja fisiológica de 2 µg/ml de KGI 1 inhibe la proliferación y reduce el número de células cancerosas detectadas después de 18 horas de exposición medidas como la viabilidad celular en cultivo coincidiendo en el tiempo con la actividad de TK reducida como se muestra en la Fig. 9.6.

**[0194]** Partículas y KGI 1 libre a una concentración de 2 µg/ml redujo la viabilidad celular y el metabolismo después del tratamiento de células U937 durante 24 horas, que se midió en este experimento (Fig 9.8). La concentración de 0,5 µg/ml de partículas o KGI 1 libre redujo la viabilidad celular después del período de tratamiento de 24 horas. La inhibición del metabolismo celular en 0,5 µg/ml era más prominente después del tratamiento con KGI 1 después de con KGI 1 libre. En general partículas KGI 1 eran inhibidoras más eficientes de crecimiento de células cancerosas medidas tanto por el metabolismo celular como la viabilidad. También hay una buena correlación entre el número de células viables y la actividad metabólica celular.

#### Discusión y conclusión

**[0195]** Células cancerosas de U937 tratadas con una dosis baja de 2 µg/ml de KGI 1 no redujo la actividad de TK \_ cuando se mide en células no sincronizadas después de 24 horas, pero después de 48 horas que refleja el efecto inhibidor de KGI 1 es el final del primer ciclo (Fig. 9.2 - 9.5). En células sincronizadas, la inhibición de la actividad de TK aparece antes (Fig. 9.6). La actividad de TK es temprana en el ciclo de crecimiento celular. Una alta concentración de 25 mg/ml de KGI 1 reduce la actividad TK anteriormente. Muy probablemente, el tratamiento de KGI 1 hace que las células salgan del ciclo celular. En general, la actividad de los TK cesó después de 5 días de tratamiento con KGI 1 en dosis fisiológicas. Debe tenerse en cuenta que la actividad TK medida incluye la suma de quinasa de timidina producida recientemente y quinasa de timidina residual que se espera que dure durante algún tiempo a partir de los ciclos anteriores. La alta dosis de KGI 1 de 25 µg/ml redujo la actividad TK a 50% registrada después de la incubación durante 24 horas, indicando que una dosis alta interfiere con el crecimiento celular más temprano en el ciclo de crecimiento celular. La actividad de TK reducida se refleja y coincide en el tiempo con la inhibición metabólica (análisis de AlamarBlue), y el número reducido de células viables se midió mediante tinción con azul de tripán (Figs.9.7 y 9.8). La disminución del número de células cancerosas después del tratamiento con KGI 1 durante 18 horas en cultivos celulares sincronizados indica un efecto inhibidor por KGI 1 en el primer ciclo celular.

**[0196]** La muerte de células cancerosas apoptóticas (Ejemplo 7) se provoca hacia 24 horas y la muerte apoptótica coincide con los efectos tempranos de dosis altas y bajas de KGI 1 sobre la actividad de TK. Debe observarse que en la fase temprana de la muerte de células cancerígenas inducida por KGI 1, el número de células necróticas no excedió de las células no tratadas (véase el Ejemplo 7). La conclusión es que el número de células acumuladas teñidas tanto por PI (necrosis) como por Anexina V (apoptosis), en gran medida, proviene de células apoptóticas provocadas por KGI 1.

**[0197]** Sin embargo, no se puede descartar que el efecto temprano de dosis más altas de KGI 1 tiene una influencia directa sobre la producción de TK precedente a la fase S del ciclo celular.

**[0198]** El efecto de matar el cáncer de KGI 1 libre es particularmente prominente en las concentraciones más altas ensayadas es decir, 25 µg/ml y 50 µg/ml, pero a estas concentraciones, el TK fue liberado al medio de cultivo (Fig. 9.4) que indica daño de la célula membrana. A concentraciones más bajas, la forma libre tuvo una menor capacidad para reducir la actividad TK que el particulado KGI 1.

**[0199]** El efecto de matar el cáncer temprano de KGI 1 por las altas dosis de 25 µg/ml y 50 µg/ml es decir, antes de las 24 horas apunta a un mecanismo diferente ejercido en la fase temprana del ciclo celular de las bajas concentraciones de 2 µg/ml y 10 µg/ml que aparentemente está afectando a las células después de la producción de TK. Las concentraciones más altas de 25 µg/ml y 50 µg/ml de partículas KGI 1 no son líticas como lo es para la forma libre de KGI 1 es decir, fracción QHC de Quill A (Ejemplo 2).

**[0200]** En conclusión, el material en partículas KGI 1 mata las células cancerosas sin provocar una necrosis primaria incluso en dosis altas. La actividad de TK se interrumpe casi simultáneamente con la muerte apoptótica y coincide con la inhibición del metabolismo celular medida por azul alamar y la muerte celular se mide por tinción con azul tripán. KGI 1 no tiene efecto lítico a las dosis ensayadas. No se notó reversión en el cultivo prolongado. El efecto de matar la célula cancerosa por KGI 1 sigue el concepto de una salida del ciclo celular que conduce a una activación y la fase de producción y una apoptosis final. En contraste, la forma libre de KGI 1, es decir, fracción QHC de Quill A mata además de apoptosis, por necrosis y en altas dosis por efecto lítico. KGI 1 libre es menos eficaz en la destrucción de células cancerosas cuando se utilizan en dosis fisiológicas bajas. Las altas concentraciones eficaces de KGI 1 libre provocan efectos secundarios.

#### Ejemplo 10

Formulaciones de KGI inducen las células U937 a producción de citoquinas IL-8

**[0201]** Se ha demostrado que el compuesto de lipopolisacárido (LPS) estimula las células U937 a la producción de citocinas (IL-8), utilizando dosis superiores a las de KGI 1. En otro experimento Baldrige et al. (Baldrige, Cluff et al.

2002) reivindica la de aminoacilo glucosaminida 4-fosfato (APG) tuvo tal efecto estimulador sobre las células U937 medidas por la producción de citoquinas. Sin embargo, a fin de lograr esa capacidad, el cultivo tenía que ser pretratado con forbol-12-mirestato-13-acetato (PMA) para facilitar la diferenciación y activación. Este ejemplo muestra que KGI 1, 2 y 3 no requieren una activación adicional - compuesto de diferenciación para entrar en una fase de la producción de citoquinas y la dosis de formulaciones KGI requerida es baja. Por otra parte, los Ejemplos 7 y 9 muestran que KGI 1 se lleva a las células cancerosas U937 fuera del ciclo de replicación celular en la que están atrapadas las células cancerosas a menos que se trató con KGI 1. Ejemplos 7 y 9 también muestran que KGI 1 toma células U937 a la apoptosis. La apoptosis es un paso final para las células normales cuando se agotaron sus tareas, por ejemplo para la producción de citocinas. En este ejemplo, se examina la capacidad de las tres formulaciones KGI, es decir KGI 1, 2 y 3 para inducir las células U937 para producir citoquinas IL-8.

**[0202]** KGI 1, 2 y 3 se formularon como se describe en Materiales y Métodos y se añadieron en concentraciones mostradas en las Figs. 10.1, 10.2 y 10.3 a las células U937 a una densidad de  $10^6/\text{ml}$  en la placa de microtitulación. Después de la incubación durante 2 días a  $37^\circ\text{C}$ , la IL-8 se determinó en el sobrenadante. La producción de IL-8 en CL50 también se calculó como se muestra en estas figuras.

#### Resultados

**[0203]** La producción de IL-8 era 781 pg/ml a CL50 para KGI 1 (Fig.10.1), 881 pg/ml para KGI 2 (Fig. 10.2) y 916 pg/ml para KGI 3 (Fig. 10.3). Las distintas formulaciones KGI causan también diferentes grados de citotoxicidad como se muestra en estas figuras.

#### Discusión y conclusión

**[0204]** Las células U937 no producen espontáneamente citoquinas. Aunque, Baldrige et al. (Baldrige, Cluff et al. 2002) reivindican que ciertos APG a alta dosis pueden estimular a las células U937 para la producción de citocinas que requieren tratamiento previo de, por ejemplo una dosis alta de la (MPA). Este ejemplo muestra que las formulaciones KGI no necesitan un MPA o tratamiento similar para entrar en una fase de producción de citoquinas. Por otra parte, el Ejemplo 9 muestra que KGI 1 se lleva a las células cancerosas U937 fuera del ciclo de replicación celular, en la que están atrapadas las células cancerosas a menos que se trató con KGI 1. El ejemplo 4 muestra que KGI 1 toma células U937 a la apoptosis. La apoptosis es un paso final para las células normales cuando se agotaron sus tareas, por ejemplo para la producción de citoquinas. En este ejemplo, se examina la capacidad de las tres formulaciones KGI, es decir KGI 1, KGI 2 y KGI 3 para inducir las células U937 para producir citoquinas 8. En conclusión, las diferentes formulaciones KGI inducen la producción de citoquinas 8 antes de apoptosis. También BBE induce producción de IL-8 (no mostrada).

#### Ejemplo 11

##### Toxicidad aguda de KGI 1 y BBE en ratones

**[0205]** Los fármacos destinados al tratamiento del cáncer en su mayoría causan efectos secundarios junto con mala biodisponibilidad siendo la causa más común de que los compuestos potenciales para el tratamiento del cáncer no progresan en ensayos clínicos o no llegan al mercado. Saponina Quillaja se ha utilizado en más de 50 años en forma libre en los animales. Es bien sabido que las reacciones locales en forma de hinchazones, enrojecimiento y sensibilidad incluso necrosis podrían aparecer como efectos secundarios que limitan la dosis. Los efectos secundarios de este tipo no se registraron después de la incorporación de QHC en formulaciones de matriz de iscoms y de iscom, cuando se utilizaron dosis similares. Diez  $\mu\text{g}$  de QHC libre induce reacciones locales inyectadas por vía intramuscular en ratones, pero no se incorporan en formulaciones iscoms o KGI. También es bien sabido que la saponina libre interactúa con el colesterol y causa daños en la membrana celular evitados por el efecto de bloqueo de la unión de colesterol incorporado a las saponinas en las formulaciones de iscom y KGI. En este ejemplo, la toxicidad sistémica de KGI 1 y BBE se probó en ratones BALB/c. La toxicidad aguda se ensayó después de la administración subcutánea de KGI 1 y BBE en ratones BALB/c como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones se registraron durante cuatro días. Los resultados del ensayo se resumen en la Tabla 11.1 y el marcador para el grado de letargo se describe en la Tabla 11.2.

**[0206]** En el ejemplo de la toxicidad general de KGI 1 y BBE se explora y se compara con las formas libres de la saponina, es decir, la fracción C integrada de saponina *Quillaja* integrada en KGI 1 y la fracción A integrada en BBE. La dosis de 10, 30 y 50  $\mu\text{g}$  de KGI. 1, 50 y 100  $\mu\text{g}$  de BBE se inyectaron por vía subcutánea en los ratones BALB/c, que se observaron durante 4 días.

Tabla 11.1 Comparación de toxicidad de KGI libre y particulado

| Saponina<br>(rel. de peso)<br>ug/dosis | Letargía<br>(0-3)* | Mortalidad<br>(%) | Agrandamien<br>to/oscuridad<br>hígado |      | Agrandamien<br>to/oscuridad<br>bazo |      | Intestino<br>(0-3) |
|----------------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------------------|------|-------------------------------------|------|--------------------|
| KGI 1 libre 50                         | 1,8                | 38                | 0,63                                  | 1,8  | 2,1                                 | 2,8  | (diarrea)<br>1,5   |
| KGI 1 10                               | 0,0                | 0                 | 0                                     | 0    | 0,0                                 | 0    | 0                  |
| 100% 30                                | 0,6                | 0                 | 0,13                                  | 0    | 0,75                                | 0,65 | 0                  |
| 50                                     | 0,6                | 0                 | 0,12                                  | 0,63 | 2,0                                 | 1,63 | 0                  |
| BBE libre 50                           | 0,4                | 0                 | 0                                     | 0,75 | 0                                   | 0,75 | 0                  |
| 100% 100                               | 0,7                | 0                 | 0,13                                  | 0,5  | 1,13                                | 1,62 | 0                  |
| BBE 50                                 | 0,2                | 0                 | 0                                     | 0    | 0,5                                 | 0,5  | 0                  |
| 100% 100                               | 1,2                | 0                 | 0,24                                  | 0,38 | 0,88                                | 0,88 | 0                  |

Tabla 11.2 Puntuación para grado de letargía

| GRADO DE LETARGÍA                                                                                                   | 0                               | 1                          | 2                   | 3                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| Seguimiento del movimiento de las personas                                                                          | Si, cuando no se está durmiendo | No                         | No                  | No                  |
| Cuando se transporta los animales a un nuevo lecho (durante la limpieza), se mueven y descubren el nuevo entorno    | Inmediatamente                  | Lentamente                 | Muy lentamente o no | No                  |
| Cuando reciben nueva comida, la huelen y la "comprueban"                                                            | Inmediatamente                  | Lentamente o no            | No                  | No                  |
| Los ratones se escapan, cuando se golpea la pared exterior de la caja con un lápiz, donde se encuentran los ratones | Inmediatamente                  | Lentamente                 | No                  | No                  |
| Los ratones se escapan, cuando se golpea la parte inferior con un lápiz                                             | Inmediatamente                  | Inmediatamente             | Lentamente          | No                  |
| Cuando se aprieta la cola de los animales con pinzas, causando ligero dolor, intentan escaparse                     | No se requiere esta prueba      | No se requiere esta prueba | Inmediatamente      | Muy lentamente o no |

## Resultados

[0207] Los efectos se resumen en la Tabla 11.1. La dosis de 10 µg de KGI 1 no causó efectos secundarios detectables en los ratones. La dosis de 30 µg causó pequeñas reacciones es decir, en un agrandamiento de hígado 0,13 de escala de tres grados, 0,75 de agrandamiento de bazo, 0,65 de oscuridad de bazo. La dosis de 50 mg de KGI 1 también causó sólo pequeños cambios excepto para ampliación de bazo (2.0) y la oscuridad de bazo (1,63). Cabe señalar que KGI 1 tiene un efecto adyuvante es decir, mejorar la inmunidad, y la reacción de bazo es de una reacción normal. En contraste, la dosis de 50 µg de fracción C de forma libre causó efectos secundarios graves incluyendo la mortalidad al 38% y altas puntuaciones para letargo (1,8), la ampliación del bazo (2.1), la oscuridad del bazo (2.8) y diarrea. Partículas BBE son conocidas por ser virtualmente no tóxicas y la única reacción notable es el agrandamiento del bazo, que es probablemente debido a su efecto adyuvante.

## Discusión y conclusión

[0208] La reacción sistémica de 50 µg de KGI 1 estando suficientemente cerca de una dosis humana calculada (100 µg de KGI 1) causó un bajo grado de efectos secundarios y sin mortalidad en ratones BALB/c de 18 g tomando en consideración a 60 kg de un ser humano. En contraste, esta dosis (50 g) de las formas libres de la fracción C de Quillaja siendo la saponina en KGI 1, causó mortalidad y diarrea. Una dosis de 100 µg de KGI 1 también causa la mortalidad, y que debe tomarse en consideración que la biodisponibilidad de la partícula KGI 1 es superior a la de la fracción C. La partícula BBE demostró ser virtualmente libre de efectos secundarios. El único efecto destacado fue el resultado de la ampliación del bazo siendo un reflejo de su fuerte efecto inmuno-modulador. Estudios anteriores han demostrado que las formas libres de fracciones de saponina de Quillaja como QS 21 y QHC causan reacciones locales, que se evitan por las formas de partículas debido al efecto de bloqueo del colesterol ligado a la saponina en las partículas KGI y BBE, así como a todas las formas de partículas de iscom. Esto es, la saponina en las partículas mencionadas no pueden interactuar con el colesterol en las membranas celulares.

**Ejemplo 12**

[0209] Killcan establece un nuevo uso y un nuevo concepto para el tratamiento del cáncer basado en el sistema de suministro de iscom demostrado desarrollado para la estimulación inmune. Sistemas tradicionales de eliminación de células normales, la terapia de radiación también efectúa células normales y cirugía con sus limitaciones. Un concepto moderno para la terapia del cáncer consiste en interferir con la biología de la replicación como se discute en los ejemplos 7 y 9. La replicación incontrolada es la principal fuerza impulsora para la mayoría de las formas de cáncer para la supervivencia de células cancerosas y patogenicidad. El concepto Killcan está utilizando el sistema iscom bien establecido demostrado como productos comerciales, como sistema de administración de los compuestos por la orientación hacia poblaciones de células y la orientación de compartimentos intracelulares tales como endosomas y lisosomas y el citosol. Mediante el uso del sistema de iscom, el concepto Killcan es un controlador para una actuación normal de desarrollo de las células por la modulación, la activación, diferenciación que conduce al final definido y asintomático de la muerte celular programada (apoptosis). Por lo tanto, en el presente concepto de terapia del cáncer, se utiliza la experiencia adquirida de la tecnología de iscom, documentada en 300 publicaciones siendo bien examinada para una excelente biodisponibilidad, la orientación de las células y el suministro intracelular, baja toxicidad y otras propiedades bio-funcionales. La documentación se inicia con la primera publicación por Morein et al. (Morein, 1984) para una revisión reciente (Morein, 2007).

[0210] Los análisis actuales de las diversas formulaciones BBE y KGI se llevaron a cabo por el grupo del profesor Rolf Lasson en Farmacología Clínica, Universidad de Uppsala usando su tecnología (Dhar, 1996). Las muertes, inhibición del crecimiento e incluso efectos sinérgicos por varias combinaciones eran de hecho efectos inesperados de cubrimiento contra las células cancerosas procedentes de mieloma, como linfomas y cánceres sólidos. Por otra parte, mutantes de escape y células cancerosas de los tumores de difícil o imposible tratamiento han sido sensibles a una o más de las formulaciones KGI o BBE, lo cual era de hecho imprevisible.

**Panel de la línea celular tumoral humana**

[0211] Para evaluar los patrones de actividad de los fármacos un panel de línea celular humana (Dhar, 1998) de cuatro líneas celulares parentales sensibles, cinco sublíneas resistentes a los fármacos, lo que representa diferentes mecanismos de resistencia, y se utilizó una línea de células con resistencia primaria. Las líneas celulares incluidas fueron la línea celular de mieloma RPMI 8226/S y sus sublíneas 8226/Dox40 y 8226/LR-5 (regalos de W.S. Dalton, Departamento de Medicina, Centro de Cáncer de Arizona, Universidad de Arizona, Tucson, AZ), las líneas celulares de linfoma T-937 GTB y U-937-VCR (regalos de K. Nilsson, Departamento de Patología, Universidad de Uppsala, Suecia), la línea celular NCI-H69 CEP y su sublínea H69AR, cáncer de mama MCF-7 y la línea de células de cáncer de cuello uterino Hela (American Type Culture Collection; ATCC, Rockville, MD), la línea celular de adenocarcinoma renal ACHN (ATCC) y la línea celular de leucemia CCRF-CEM y su sublínea CEM/VM-1 (regalos de W.T. Beck, Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Tennessee, Memphis, TN).

[0212] El 8226/Dox40 fue seleccionado para la resistencia a doxorubicina y muestra el fenotipo MDR clásico con la sobreexpresión de glicoproteína P-170 (Pgp). Se seleccionó el 8226/LR-5 para la resistencia a melfalán, propuesto para ser asociado con un aumento de los niveles de GSH. El U-937-Vcr fue seleccionado para la resistencia a vincristina, propuesto para ser tubulina asociada. El H69AR, seleccionado para la resistencia a doxorubicina, expresa un fenotipo MDR propuesto para estar mediado por MRP. El CEM/VM-1, seleccionado por resistencia de tenipósido, expresa una MDR atípica, que se propone para asociada a topoisomerasa II (topoII). El mecanismo exacto de la resistencia para la línea celular de ACHN resistente primaria no es conocida y puede ser multifactorial.

[0213] Las líneas celulares se cultivaron en el medio de cultivo completo descrito en la sección 3.2 a 37°C en atmósfera humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub>. El 8226/Dox40 se trató una vez al mes con doxorubicina a 0,24 µg/ml y el 8226/LR-5 en cada cambio de medio con melfalán a 1,53 µg/ml. El U-937-Vcr fue continuamente cultivado en presencia de 10 µg/ml de vincristina y la H69AR fue alimentada alternativamente en medio libre de fármacos y medio que contiene 0,46 µg/ml de doxorubicina. La línea celular CEM/VM-1 se cultivó en medio libre de fármacos sin ninguna pérdida de resistencia durante un período de 6-8 meses. Los patrones de resistencia de las líneas celulares fueron confirmadas rutinariamente en experimentos de control.

**Tabla 12.1.** Líneas celulares tumorales humanas utilizadas en el estudio

| <i>Línea celular</i> | <i>Origen</i>                        | <i>Selección de agente</i> | <i>Resistencia asociada con</i> |
|----------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| CCRF-CEM             | Leucemia                             | -                          |                                 |
| CEMNM-1              | "                                    | tenipósido                 | topoisomerasa II                |
| ACHN                 | Cáncer renal                         | -                          | (resistencia primaria)          |
| NCI-W69              | Cáncer de pulmón de células pequeñas | -                          |                                 |
| H69AR                | "                                    | doxorubicina               | MRP                             |
| RPMI 8226/S          | Mieloma                              | -                          |                                 |
| 8226/dox40           | "                                    | doxorubicina               | Pgp                             |
| 8226/LR5             | "                                    | melfalán                   | glutathione                     |
| U-937 GTB            | Linfoma                              | -                          |                                 |
| U-937-vcr            | "                                    | Vincristina                | Tubulina                        |
| Hela                 | Carcinoma de cuello uterino          | -                          |                                 |
| MCF-7                | Cáncer de mama                       | -                          |                                 |

## Reactivos y Drogas

**[0214]** Un medio completo que consiste en medio de cultivo de carbonato tamponado RPMI-1640 (Hyclone, Cramlington, Reino Unido) suplementado con 10% de FCS inactivado, 2 mM de glutamina, 50 µg/ml de estreptomicina y 60 µg/ml de penicilina se utilizó. FDA (Sigma, St Louis, MO) se disolvió en DMSO y se mantuvo congelado (-20°C) como una solución madre protegida de la luz.

**[0215]** Se recibieron los compuestos de ensayo a partir de DueCom AB como soluciones madre 10 mM en DMSO. Las soluciones madre se diluyeron diez veces con fosfato tamponado salino (PBS; Sigma Aldrich) para borrar soluciones. El uso de un sistema de robot BIOMEK-2000 los fármacos se diluyeron adicionalmente (por dilución en serie de diez veces y se sembraron en placas de microtitulación de 384 pocillos (NUNC).

## Ensayo de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA)

**[0216]** Las células tumorales se sembraron en placas de microtitulación de 384 pocillos preparadas por fármaco a una densidad celular de 5.000 células/pocillo. El ensayo de citotoxicidad de microcultivo fluorométrico (FMCA) se basó en la medición de la fluorescencia generada a partir de hidrólisis de la FDA para la fluoresceína por las células con membranas plasmáticas intactas y se ha descrito en detalle anteriormente [14]. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada que contiene 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Al final del periodo de incubación se retiró por aspiración. Después de un lavado en PBS, 50 µl/pocillo de FDA disuelto en un tampón fisiológico (10 µg/ml) se añadió. Las placas se incubaron durante 45 minutos y la fluorescencia generada a partir de cada pocillo se midió en un fluorómetro de escaneo de 384 pocillos, la fluorescencia es proporcional al número de células intactas en el pozo.

**[0217]** Los criterios de calidad para un análisis exitoso incluyen una señal de fluorescencia en los pocillos de control de más de cinco veces el valor medio en blanco, un coeficiente medio de variación (CV) en los pocillos de control de menos de 30%.

## Cuantificación de los resultados FMCA

**[0218]** La supervivencia celular se presenta como el índice de supervivencia (SI), definido como la fluorescencia en los pocillos experimentales en por ciento de la en los pocillos de control, restándose los valores en los pocillos en blanco.

## Resultados

**[0219]** Las formulaciones KGI y BBE en diferentes combinaciones mataron las células cancerosas procedentes de las tres categorías de cáncer examinadas, es decir, linfoma, mieloma A y tumores sólidos. Las diferentes formulaciones ensayadas cubren diferentes aspectos de la destrucción de células cancerosas o la inhibición del crecimiento como se revela en la Tabla 12.2.

- KGI 1 tuvo un efecto de eliminación o inhibición del crecimiento sobre 7 de cada 11 células examinadas incluyendo linfoma, mieloma y el mutante de escape de pequeña célula cancerosa de pulmón H69AR.
- BBE es virtualmente no tóxico para las células normales examinadas y células U937 utilizadas en el modelo descrito anteriormente. Inesperadamente, consistió en eliminación/inhibición del crecimiento sobre las dos células, es decir, siendo U937/vcr un escape de la U937/GTB resistente a BBE. Más notablemente, la célula ACHN era resistente a KGI 1 pero sensible a BBE y KGI 2 también contiene QHA, el componente activo de BBE.
- KGI 3 tuvo un efecto de eliminación o crecimiento sobre la inhibición de 6 de las 11 células ensayadas. Las

células de leucemia eran más sensibles a formulación de KGI 3. Junto con KGI 2 era la única formulación ensayada que tiene efecto sobre las células de cáncer de mama HELA e incluso efecto potente cuando otras formulaciones fueron resistentes.

- KGI 2 tuvo un efecto de eliminación o crecimiento sobre 5 de las 11 células ensayadas. Junto con KGI 3 era el único que tuvo efecto e incluso efecto potente las células de cáncer de mama HELA e incluso efecto potente.
- BBE/KGI 1 tuvo un efecto de eliminación o crecimiento sobre 5 de las 11 células ensayadas. Notable es el efecto potente sobre las células principalmente resistentes ACHN que eran resistentes a KGI 1 y a las células de mieloma resistentes a 8226/dox40; estas células también fueron sensibles a KGI 2, pero no otras formulaciones ensayadas.

## Discusión y conclusión

[0220] Las diversas formulaciones basadas en la modulación de células - activación - diferenciación y propiedades apoptóticas exhiben una gama sorprendentemente amplia de propiedades de eliminación de cáncer o inhibición de crecimiento. A pesar del hecho de que los componentes son saponinas, pero no teniendo el efecto lítico de saponina tienen efectos complementarios aparentes resultando que todas las formulaciones tenían distintos perfiles diferentes con respecto a los efectos sobre las diferentes células cancerosas ensayadas. El perfil total en las formulaciones ensayadas en la eliminación o inhibición de crecimiento en células cancerosas cubrieron 10 de los 11 tipos de células cancerosas de prueba ensayadas, La única célula totalmente insensible era la línea celular de cáncer de pulmón pequeño H69. Un mutante de escape era sensible a KGI 1 y KGI 3, aunque en grado limitado.

[0221] En conclusión, se encontró inesperadamente que un sistema bien documentado demostrado bien aceptado por las células normales tiene propiedades de eliminación o inhibición de crecimiento que cubrían una amplia gama de tipos de cáncer. En vista de las propiedades de administración bien documentadas de las partículas de eliminación de cáncer, el sistema es muy adecuado para la terapia de combinación ya sea con sustancias de saponina, pero también otros fármacos contra el cáncer preferiblemente que actúan por otros mecanismos. En apoyo de este efecto esperado es la capacidad de las diversas formulaciones para hacer escapar a mutantes provocada por otros compuestos a los que las células cancerosas originalmente eran sensibles.

**Tabla 12.2** Eliminación/inhibición de crecimiento de varias células cancerosas expresadas como CI50 (µg/ml) procedentes de linfóide, mielóide y tumores sólidos (Tabla 12.1). Diferentes efectos de los compuestos solitarios en una y la misma partícula es decir BBE y KGI 1, combinación de varias fracciones de saponina de quillaja en una partícula (KGI 3), dos componentes en una y la misma partícula (QHA y QHC, es decir KGI 2) y partículas BBE mezcladas con KGI 1 en partículas separadas en la relación de 4:1 BBE/KGI 1

| Línea celular | Formulaciones |       |       |       |           |
|---------------|---------------|-------|-------|-------|-----------|
|               | BBE           | KGI 1 | KGI 2 | KGI 3 | BBE+KGI 1 |
| U937/GTB      | 100           | 0,33  | 0,34  | 0,29  | 0,36      |
| U937/vcr      | 9,4           | 0,3   | 0,3   | 0,22  | 0,37      |
| CEM/S         | 100           | 0,54  | 100   | 0,44  | 100       |
| CEM/R         | 100           | 6     | 100   | 100   | 100       |
| H69           | 100           | 100   | 100   | 100   | 100       |
| H69AR         | 100           | 27,2  | 100   | 61    | 100       |
| ACHN          | 4,8           | 100   | 2,8   | 18    | 4,2       |
| 82226/S       | 100           | 11,5  | 10,6  | 100   | 71        |
| 8226/dox40    | 100           | 100   | 4,8   | 100   | 4,4       |
| 8226/LR5      | 100           | 12,3  | 100   | 100   | 100       |
| HeLa          | 100           | 100   | 5,5   | 5,8   | 100       |

## Referencias

### [0222]

Baldrige, J. R., C. W. Cluff, et al. (2002). "Immunostimulatory activity of aminoalkyl glucosaminide 4-phosphates (AGPs): induction of protective innate immune responses by RC-524 and RC-529." Endotoxin Res 8(6): 453-8.

Berendt, M. J. y J. L. Ives (1985). "Developmental status of synthetic immunomodulators." Year Immunol: 193-201.

Blair, A. H. y T. I. Ghose (1983). "Linkage of cytotoxic agents to immunoglobulins." J Immunol Methods 59(2): 129-43.

Cheng, K. T., S. E. Seltzer, et al. (1987). "The production and evaluation of contrast-carrying liposomes made with an automatic high-pressure system." Invest Radiol 22(1): 47-55.

- Conradie, J. D., M. Govender, et al. (1983). "ELISA solid phase: partial denaturation of coating antibody yields a more efficient solid phase." *J Immunol Methods* 59(3): 289-99.
- 5 Dalsgaard (1978). "A study of the isolation and characterization of the saponin Quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease." *Acta Vet Scand Suppl*(69): 7-40.
- 10 Dalsgaard, K. (1974). "Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines." *Arch Gesamte Virusforsch* 44(3): 243-54.
- Davis, M. T. y J. F. Preston (1981). "A simple modified carbodiimide method for conjugation of small-molecular-weight compounds to immunoglobulin G with minimal protein crosslinking." *Anal Biochem* 116(2): 402-7.
- 15 Dhar, S., P. Nygren, et al. (1996). "Anti-cancer drug characterisation using a human cell line panel representing defined types of drug resistance." *Br J Cancer* 74(6): 888-96.
- Dhar, S., P. Nygren, et al. (1998). "Relationship between cytotoxic drug response patterns and activity of drug efflux transporters mediating multidrug resistance." *Eur J Pharmacol* 346(2-3): 315-22.
- 20 Espinet, R. G. (1951). "Nuevo tipo de vacuna antiaftosa a complejo glucovirico." *Gac. Vet.* 74: 1-13.
- Ghose, T. I., A. H. Blair, et al. (1983). "Preparation of antibody-linked cytotoxic agents." *Methods Enzymol* 93: 280-333.
- 25 Gregoriadis, G., ed. (1984). *Liposome Technology* Vol. I, 29-31, 51-67 and 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.) Gregoriadis, G., B. McCormack, et al. (1999). "Vaccine entrapment in liposomes." *Methods* 19(11): 156-62.
- 30 Higuchi, R. et al. (1988). An Acylated Triterpenoid Saponin From *Quillaja saponaria*, *Phytochemistry* 27 (4); 1165-1168.
- Hope et al. (1985). *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 812, pp. 55-65.
- Hostettmann, K.; Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge, U.K.: Cambridge Univ. Press.
- 35 Johnson, A. G., M. Tomai, et al. (1987). "Characterization of a nontoxic mono,phosphoryl lipid A." *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5: 5512-6.
- Kensil, C. R., U. Patel, et al. (1991). "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex." *J Immunol* 146(2): 431-7.
- 40 Kersten, G. F., A. Spiekstra, et al. (1991). "On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms)." *Biochim Biophys Acta* 1062(2): 165-71.
- 45 Leung A Y., y Foster S. (1996). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, 2nd ed., John Wiley and sons (Wiley Interscience), Nueva York.
- Lipford, G. B., H. Wagner, et al. (1994). "Vaccination with immunodominant peptides encapsulated in Quil A-containing liposomes induces peptide-specific primary CD8+ cytotoxic T cells." *Vaccine* 12(1): 73-80.
- 50 Lovgren, K. y B. Morein (1988). "The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms)." *Biotechnol Appl Biochem* 10(2): 161-72.
- Lovgren, K. and B. Morein (1991). "The ISCOM: an antigen delivery system with built-in adjuvant." *Mol Immunol* 28(3): 285-6.
- 55 Lycke, N. (2004). "From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM." *Cell Microbiol* 6(1): 23-32.
- 60 Ma, J., P. A. Bulger, et al. (1994). "Impact of the saponin adjuvant QS-21 and aluminium hydroxide on the immunogenicity of recombinant OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*." *Vaccine* 12(10): 925-32.
- Madden, T. D., P. R. Harrigan, et al. (1990). "The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey." *Chem Phys Lipids* 53(1): 37-46.

Martin, R. G. and B. N. Ames (1961). "A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures." J Biol Chem 236: 1372-9.

5 Mayer, L. D., M. J. Hope, et al. (1986). "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure." Biochim Biophys Acta 858(1): 161-8.

Mayhew, E., S. Conroy, et al. (1987). "High-pressure continuous-flow system for drug entrapment in liposomes." Methods Enzymol 149: 64-77.

10 Mayhew, E., R. Lazo, et al. (1984). "Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier." Biochim Biophys Acta 775(2): 169-74.

Morein, B., B. Sundquist, et al. (1984). "Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses." Nature 308(5958): 457-60.

15 Morein, B., Hu, K. et al. (2007). "New Iscoms Meet Unsettled Vaccine Demands". Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, Capítulo 9: 191-222

20 Mowat, A. M., A. M. Donachie, et al. (2001).. "CTA1-DD-immune stimulating complexes: a novel, rationally designed combined mucosal vaccine adjuvant effective with nanogram doses of antigen." J Immunol 167(6): 3398-405.

O'Hagan, DT. "Recent developments in vaccine delivery systems". Curr Drug Targets Infect Disord. 2001 Nov; 1(3):273-86.

25 Ramon, G. (1926). Proc d s pour accroître la production des antitoxines, Ann Inst Pasteur, 40, 1-10. Rouhi A.M. (1995). Chem. Eng. News 73(37): 28-35.

30 Ronnberg, B., M. Fekadu, et al. (1997). "Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity." Vaccine 15(17-18): 1820-6.

Ronnberg, B., M. Fekadu, et al. (1995). "Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix." Vaccine 13(14): 1375-82.

35 Stewart-Tull, D. E. (1985). "Immunopotentiating conjugates." Vaccine 3(1): 40-4.

Wang, Z.P. (2005). United States Patent 20050175623

40 Warren, H. S. and L. A. Chedid (1988). "Future prospects for vaccine adjuvants." Grit Rev Immunol 8(2): 83-101.

**Reivindicaciones**

- 5      **1.** El uso de partículas de matriz de iscom que comprende al menos un lípido seleccionado entre el colesterol y fosfolípido y al menos una saponina, en la que la saponina es una fracción de saponina cruda de Quillaja Saponaria Molina o de una subfracción del mismo, cuyas partículas no contienen antígenos del cáncer, para la preparación de un producto farmacéutico para el tratamiento de cáncer.
- 10     **2.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la saponina se elige de fracción A, fracción B, fracción C, fracciones QA 1-22 de Quillaja Saponaria Molina, Spicoside y Q VAC.
- 15     **3.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la fracción de saponina es hidrofóbica, tales como fracciones que no contienen ácidos grasos por ejemplo, la fracción A, Quil 4-15, y estimula y modula la respuesta inmune tales como inmunidad mediada por células.
- 20     **4.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la fracción de saponina es hidrofóbica tales como fracciones que contienen ácidos grasos por ejemplo, en la posición 4 de las saponinas tales como la fracción C y B de Quil A o fracciones de la región entre fracciones A y B, fracciones QA 15-21 de Quillaja Saponaria Molina y tiene un efecto letal sobre las células cancerosas.
- 25     **5.** El uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que las partículas de la matriz de iscom también comprenden saponinas hidrofílicas.
- 30     **6.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en partículas de la matriz de iscom contienen al menos dos fracciones de saponina diferentes en una y la misma partícula que contiene lípidos.
- 35     **7.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las partículas de la matriz de iscom contienen al menos dos diferentes fracciones de saponina, por lo que una de las al menos dos fracciones de saponina diferente es complejo unido en un lípido que contiene partículas y la otra (las otras) de las al menos dos fracciones de saponina diferentes es (son) de complejo unido en otra (otras) partícula(s) diferente(s) física(s) de que contiene(n) lípido(s).
- 40     **8.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en el que las diferentes saponinas son hidrofílicss y saponinas hidrofóbicss.
- 45     **9.** El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en compuestos de tratamiento de cáncer adicionales se utilizan junto con las partículas de la matriz de iscom por ejemplo elegido entre compuestos de coordinación de platino, compuestos de taxano, compuestos de camptotecina, alcaloides de la vinca antitumorales, derivados de nucleósidos anti-tumorales, de mostaza nitrogenada o agentes de alquilación de nitrosourea, derivados de antraciclina antitumorales, trastzumab y derivados de podofilotoxina antitumorales, Quila A y subfragmentos de los mismos.
- 50     **10.** Kit de partes para su uso en un método de tratamiento del cáncer, que comprende al menos dos partes, en el que una parte comprende partículas de matriz de iscom que comprenden al menos una fracción de saponina, en la que la saponina es una fracción de saponina cruda de Quillaja Saponaria Molina o de una subfracción del mismo que es hidrofóbica que tiene un efecto letal sobre las células cancerosas; y la otra parte comprende lípido que contiene partículas que tienen al menos una fracción de saponina que es hidrofílica, estimulante y la modulación de la respuesta inmune, tales como inmunidad mediada por células, en la que el kit no contiene antígenos de cáncer.

55

60

65

Fig. 1.1

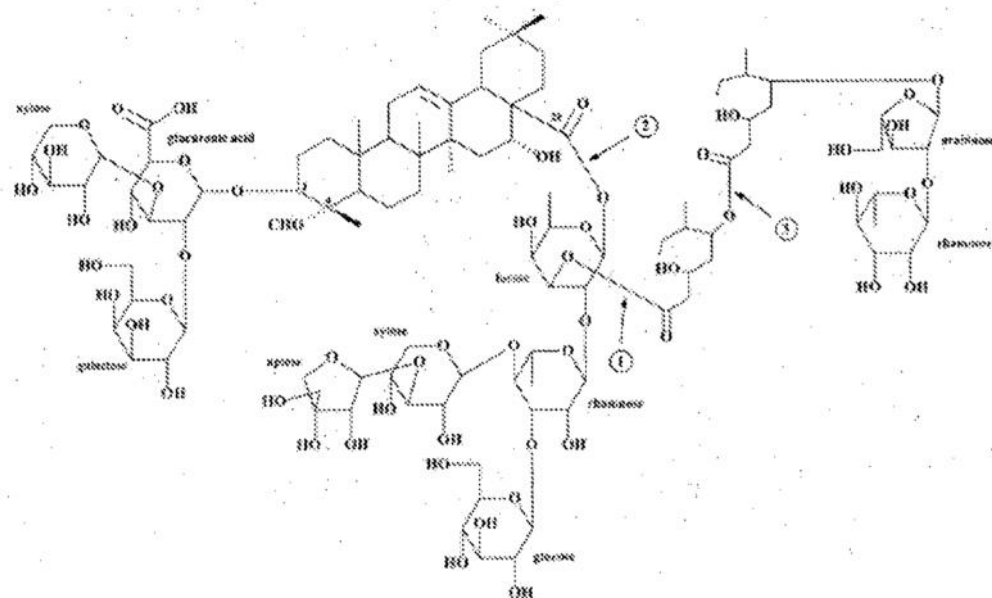


Fig. 1.2

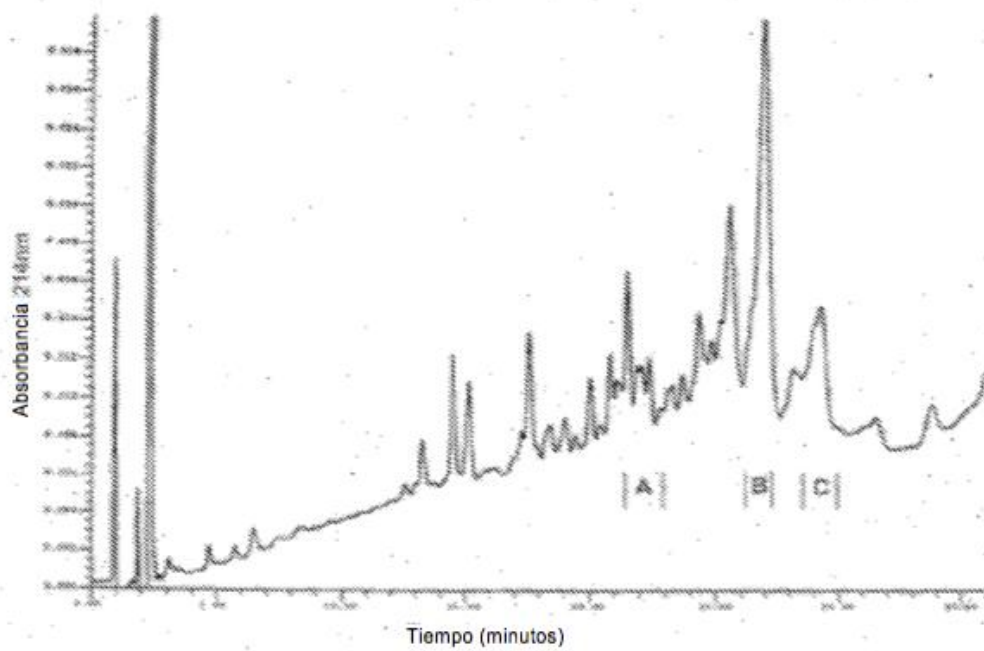


Fig. 1.3

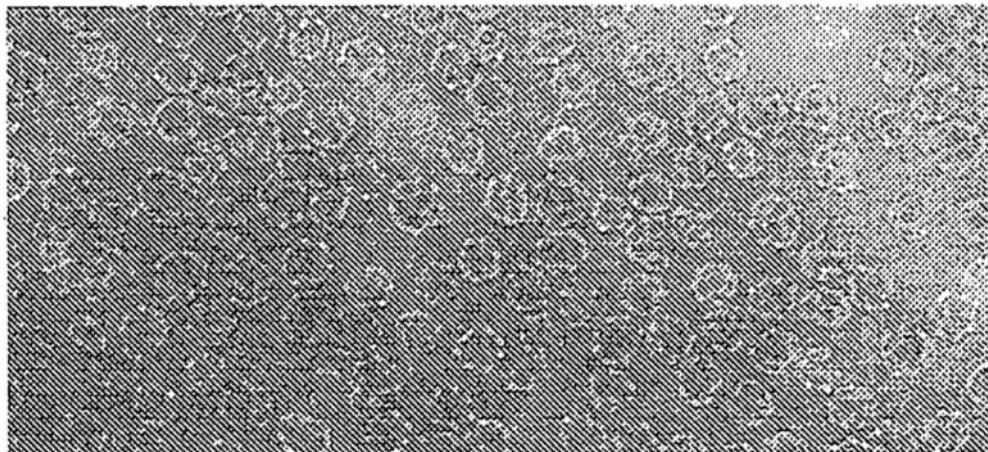


Fig. 2.1

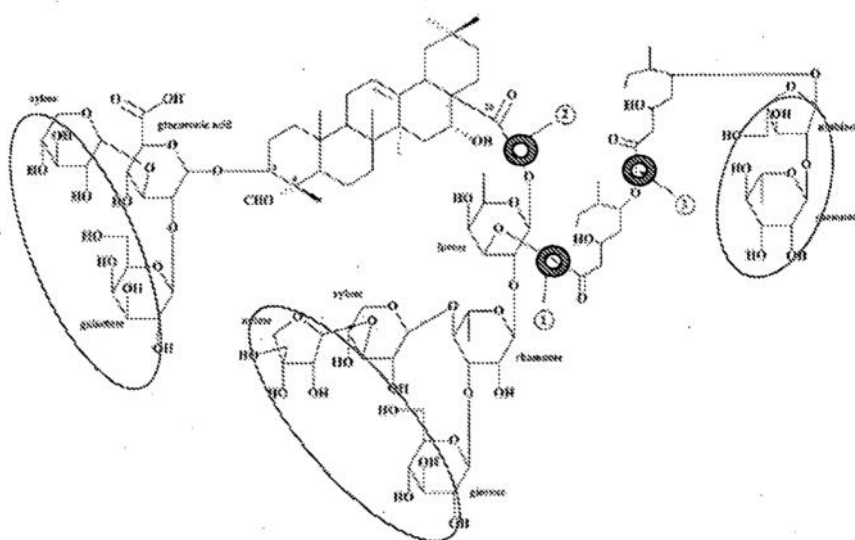


Fig. 3.1

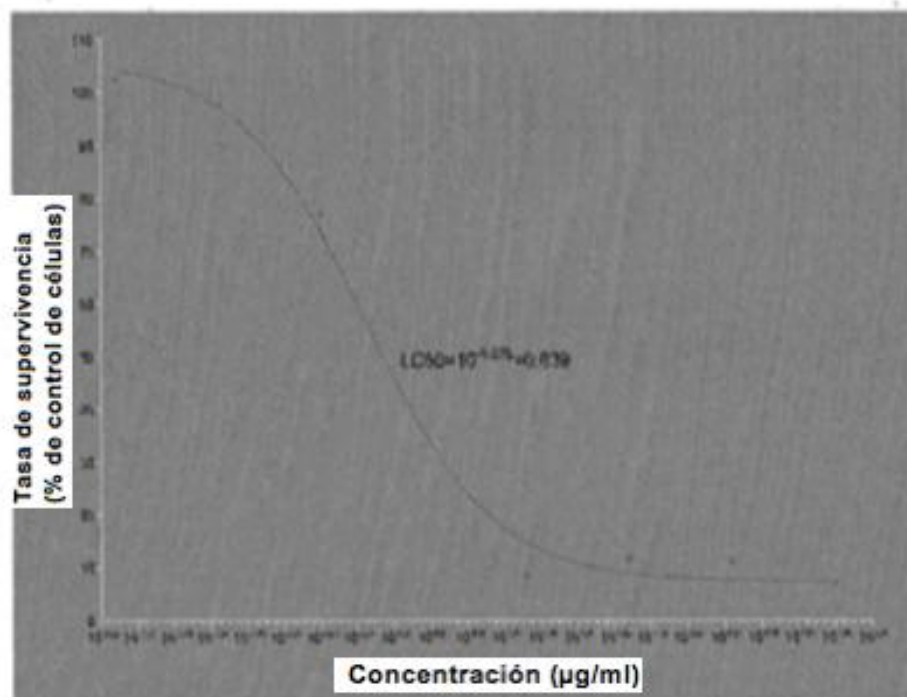


Fig. 3.2

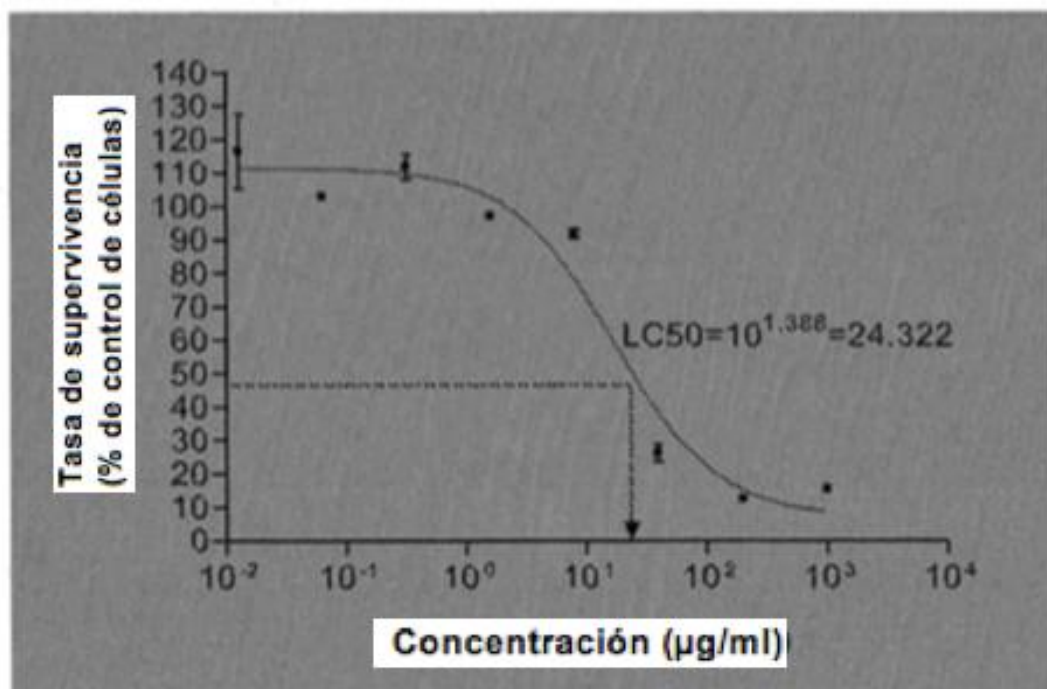


Fig. 4.1

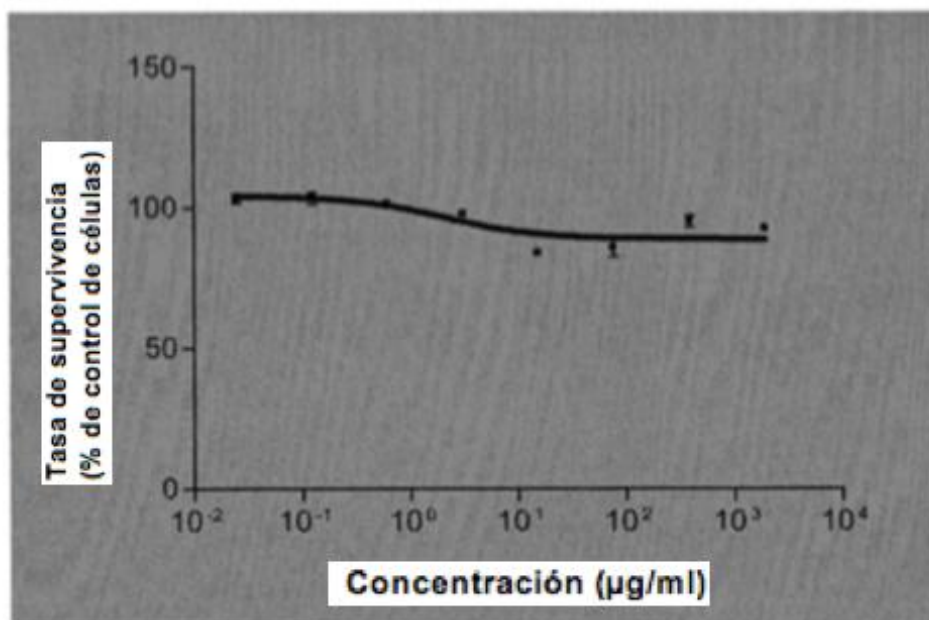


Fig. 4.2

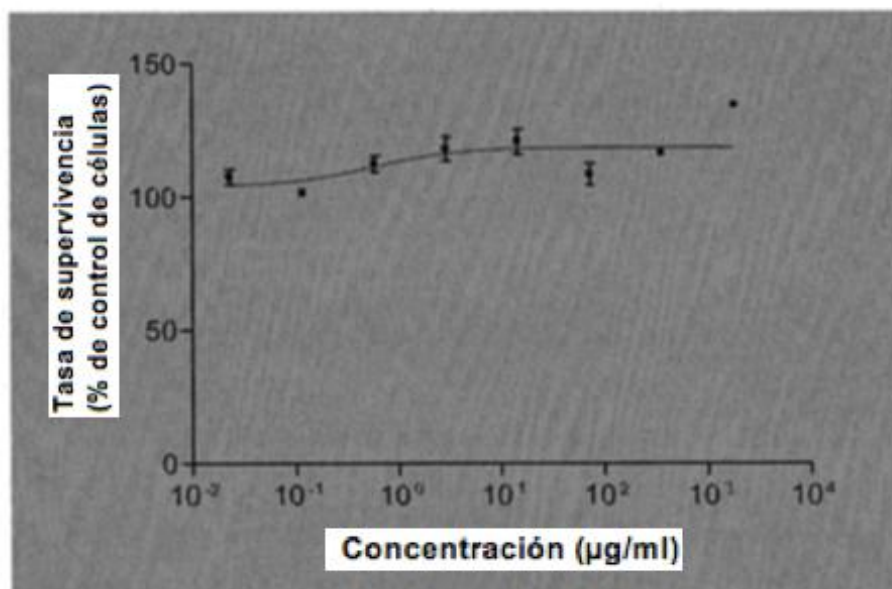


Fig 5.1

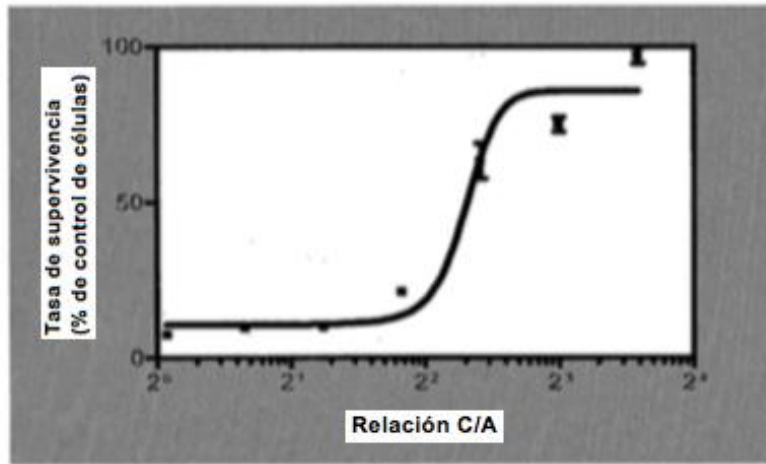


Fig. 6.1

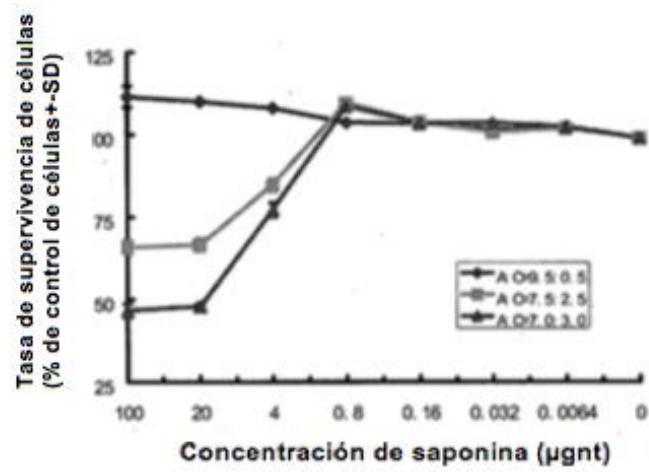


Fig. 6.2

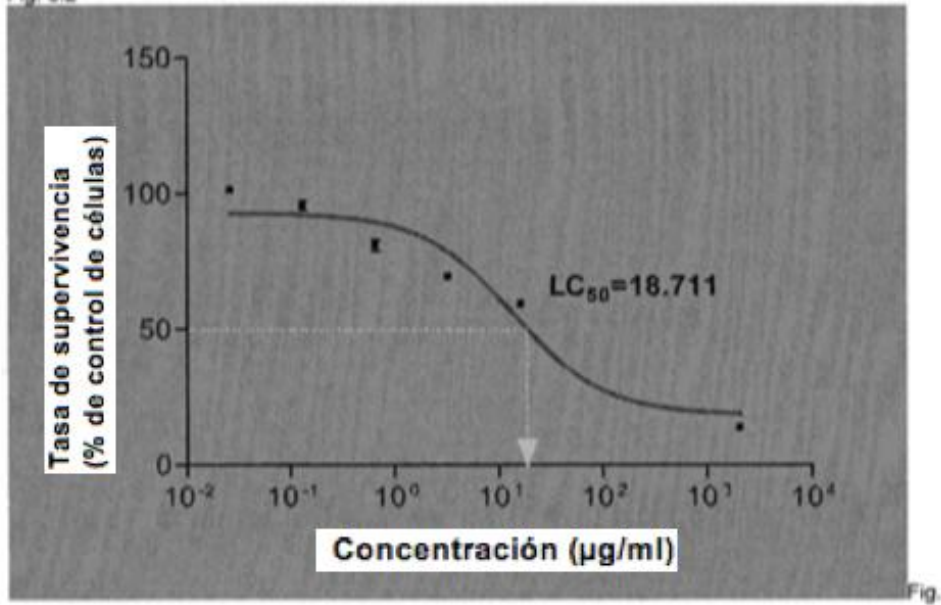


Fig. 6.3.

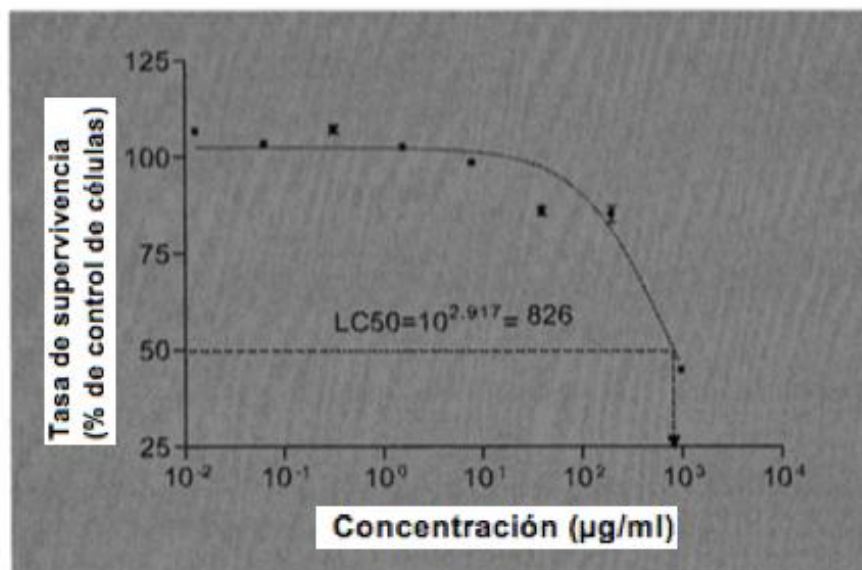


Fig. 6.4

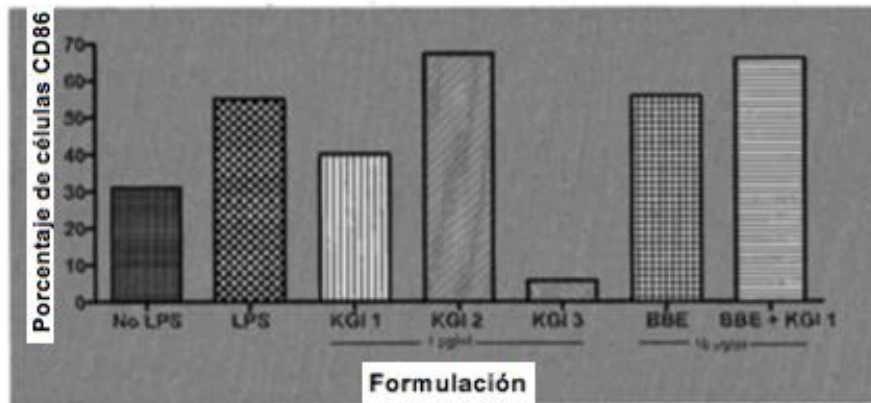


Fig. 7.1

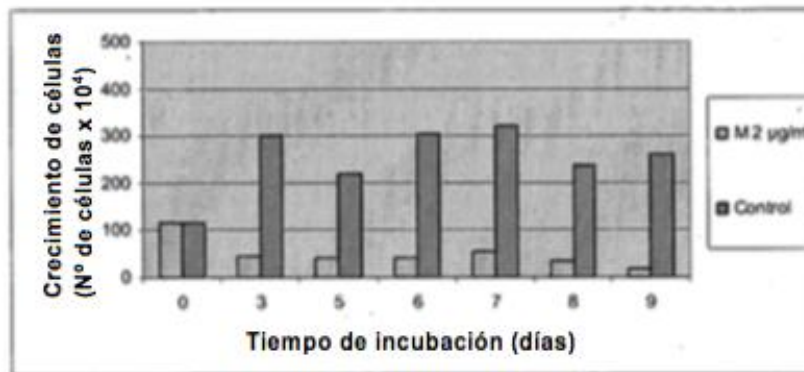


Fig 7.2

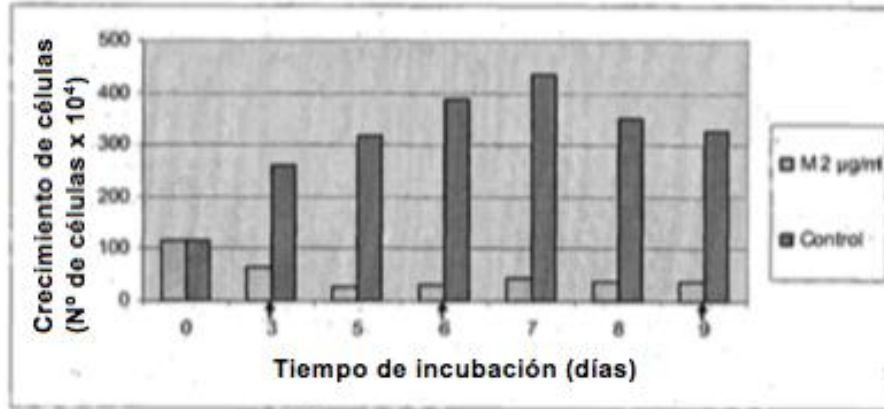


Fig. 7.3

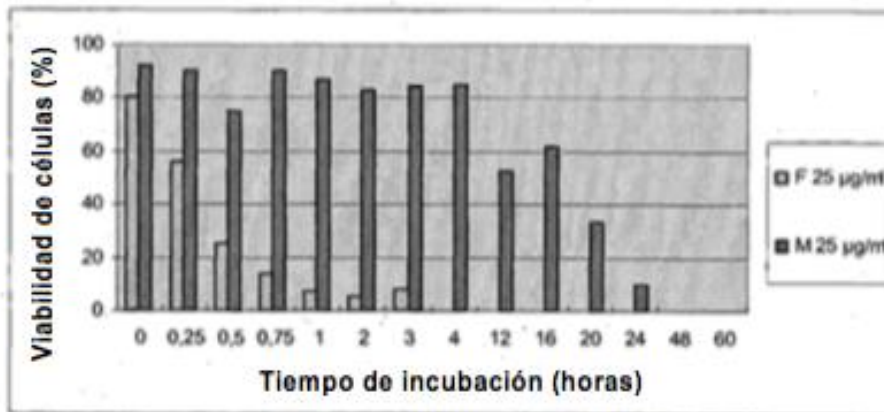


Fig. 7.4

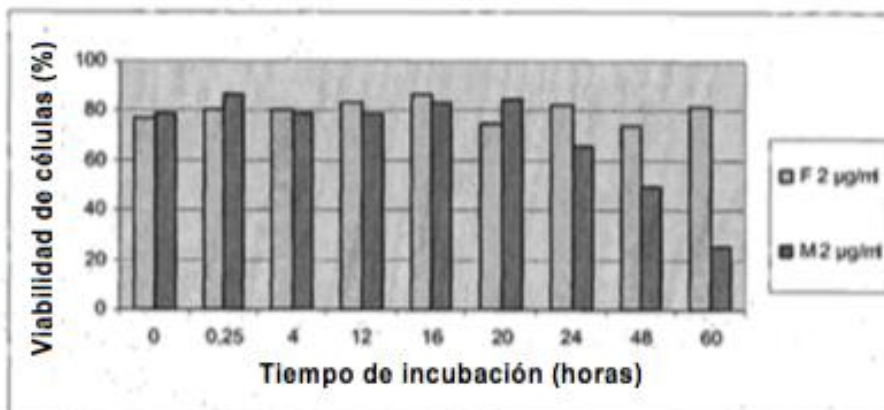


Fig 7.5.

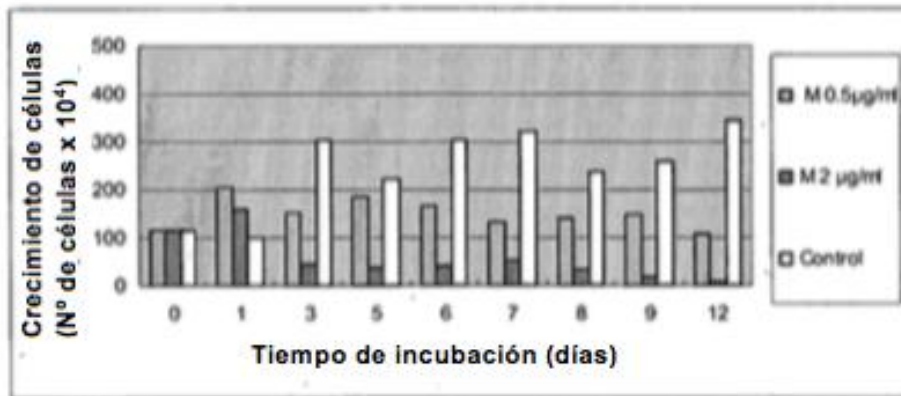


Fig. 7.6

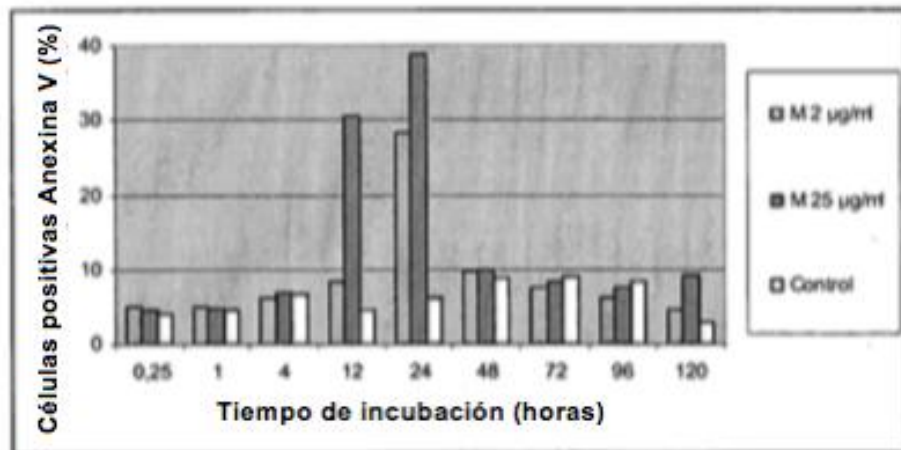


Fig. 7.7

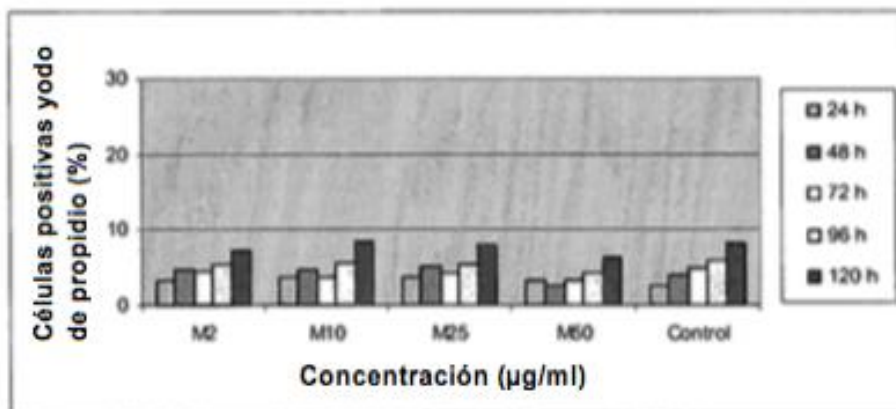


Fig. 7.8

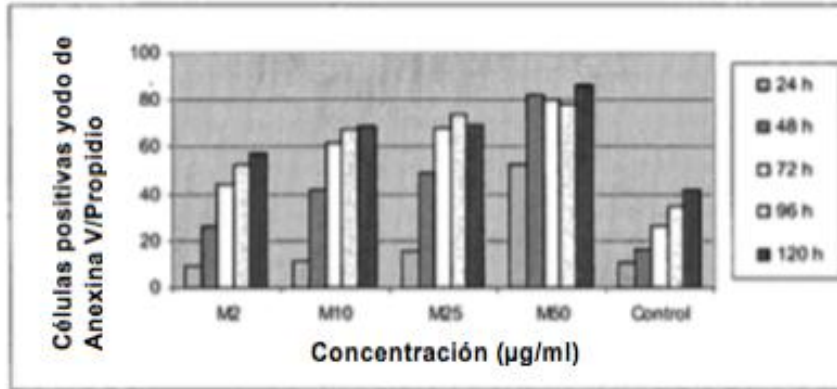


Fig. 8.1.

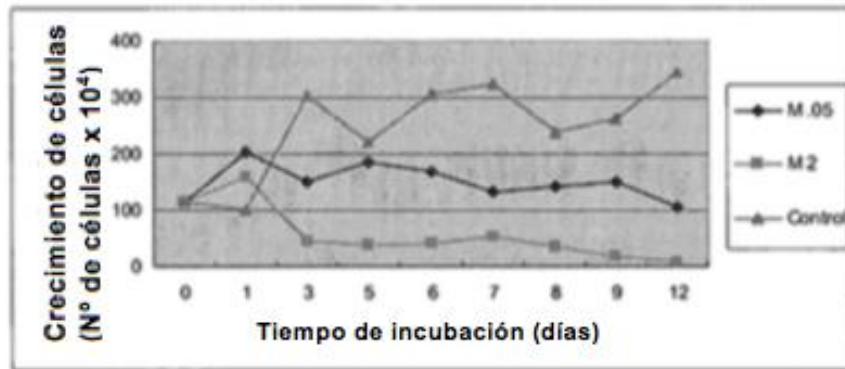


Fig. 8.2

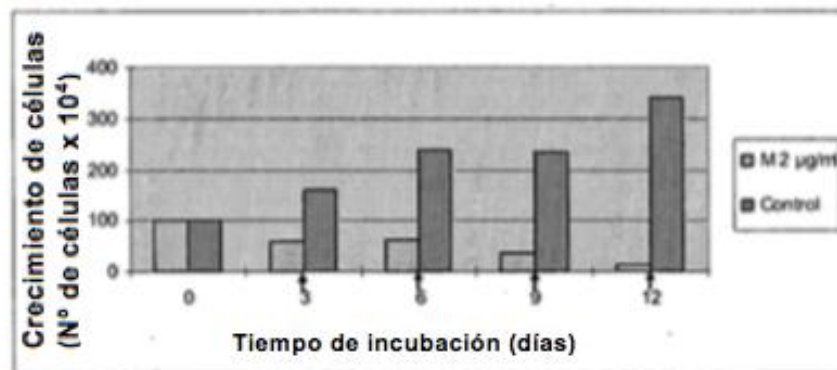


Fig. 9.1

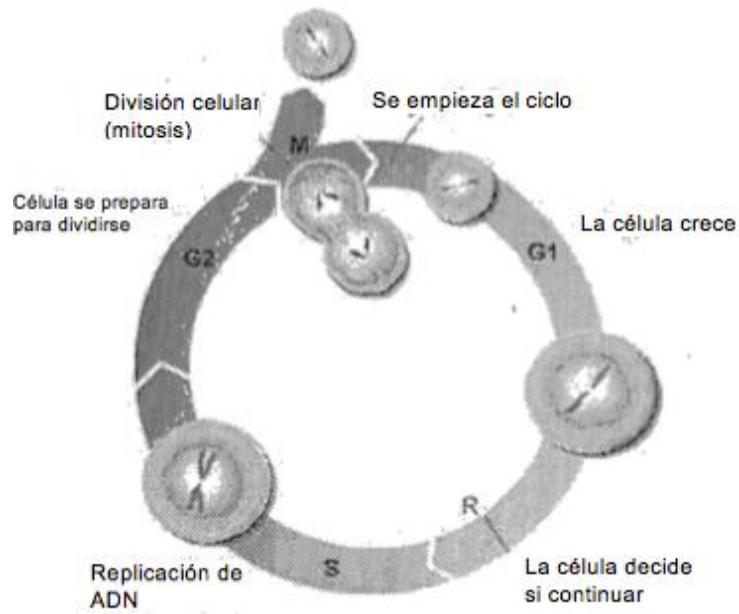


Fig. 9.2

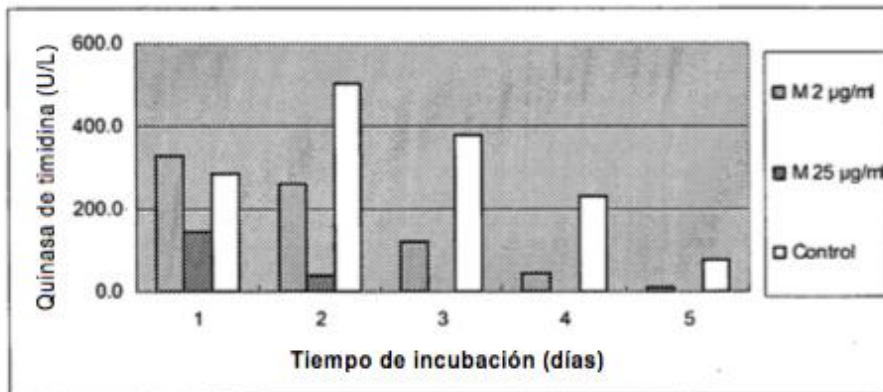


Fig. 9.3

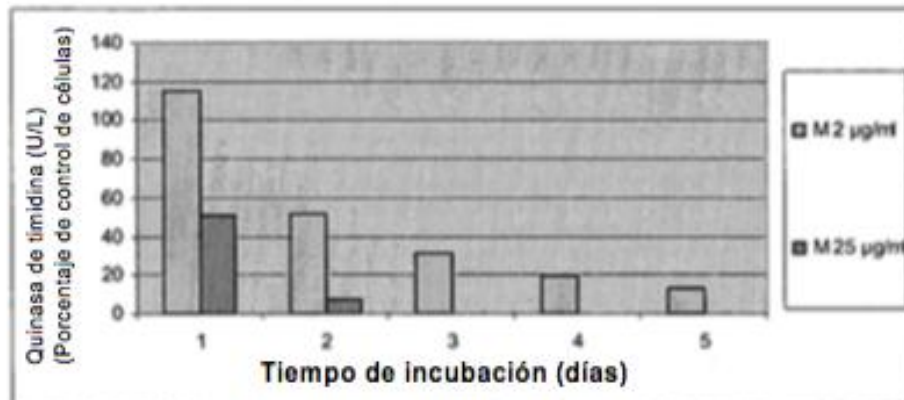


Fig. 9.4

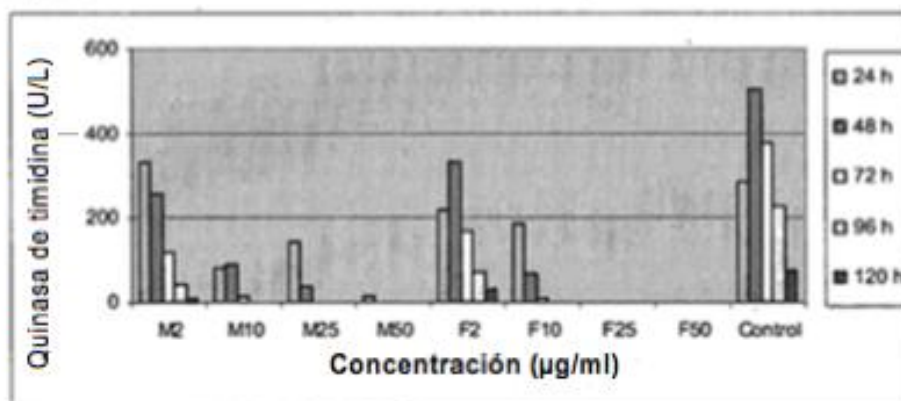


Fig. 9.5

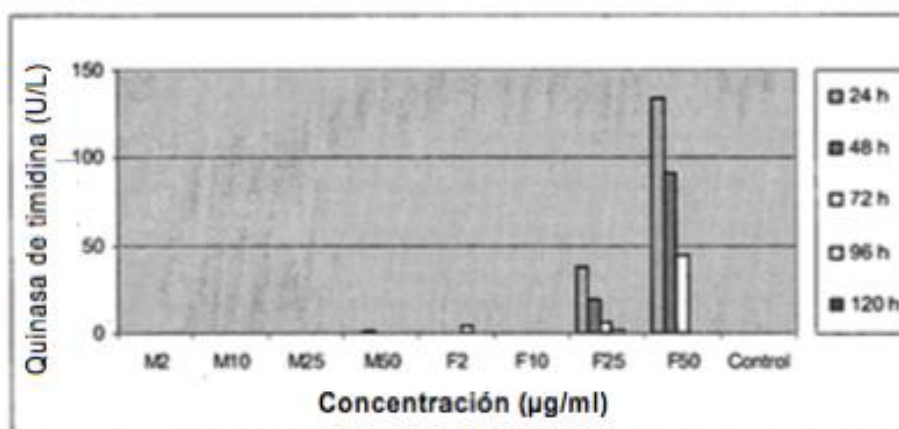


Fig. 9.6

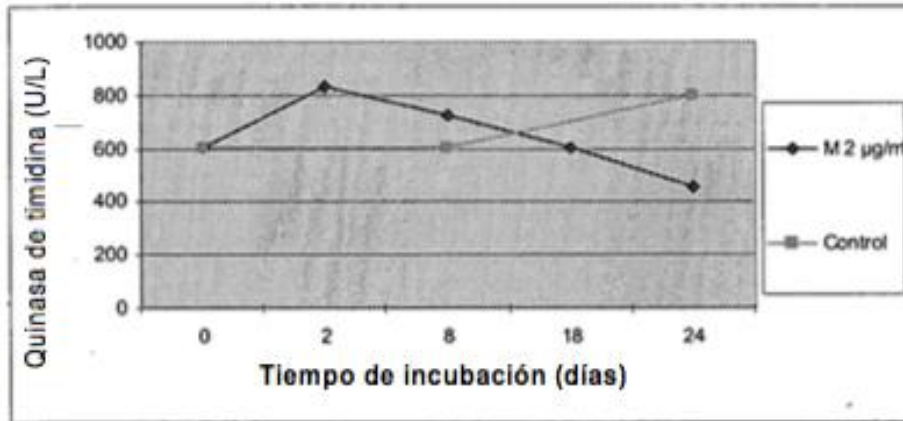


Fig. 9.7

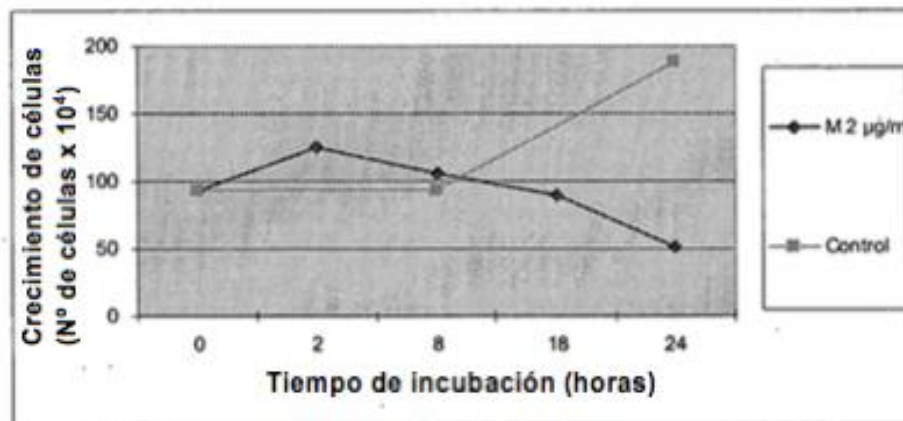


Fig. 9.8

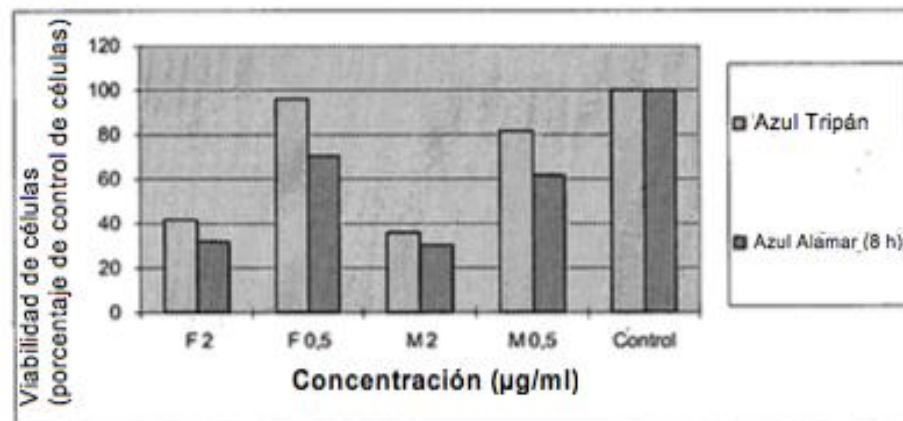


Fig. 10.1.

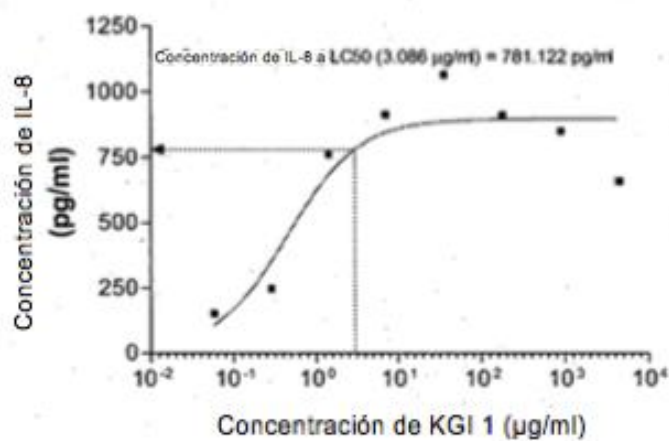


Fig. 10.2

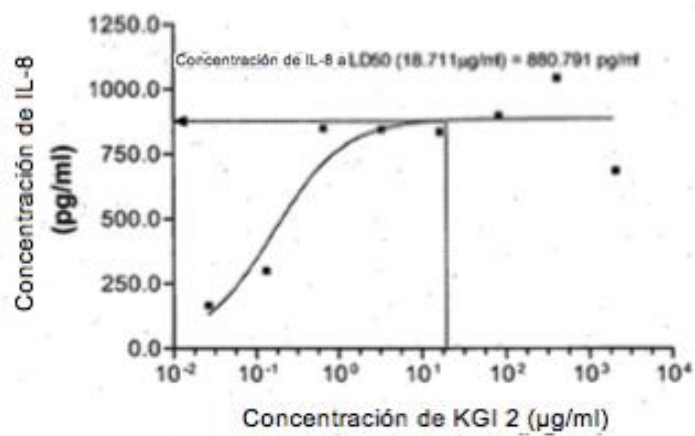


Fig. 10.3

