

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 218**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09798927 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2381949**

54 Título: **Saponinas inmunoestimulantes para usar en terapia de destrucción tumoral in situ**

30 Prioridad:

**23.12.2008 EP 08172775**

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

**26.03.2013**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL BV (50.0%)  
Wim de Körverstraat 35  
5831 AN Boxmeer, NL y  
STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT,  
UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM ST  
RADBOUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHRIER, CARLA CHRISTINA;  
NIERKENS, STEFAN;  
ADEMA, GOSSE;  
BROK DEN, MARTIJN y  
RUERS, THEODOOR JAKUES MARIE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 399 218 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).

## DESCRIPCIÓN

Saponinas inmunoestimulantes para usar en terapia de destrucción tumoral *in situ*

- 5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para usar en terapia de destrucción tumoral *in situ*, que comprende las etapas de destrucción tumoral y administración de una cantidad inmunoestimulante de una inmunopotenciación que está contenida en la composición farmacéutica, y al uso de dichas composiciones farmacéuticas en la fabricación de un medicamento.
- 10 Cáncer es un término general que se usa para describir el crecimiento neoplásico. Las neoplasias se consideran formas anormales, habitualmente desdiferenciadas, de tejido que normalmente proliferan a una velocidad mayor de lo normal. En la mayoría de los casos, las células neoplásicas invaden el tejido circundante y, además, producen metástasis y continúan creciendo en otros lugares del cuerpo.
- 15 El tratamiento local y regional de la masa neoplásica, el tumor, tal como cirugía, no afecta a las posibles metástasis. Por tanto se necesitan terapias adicionales, tales como el tratamiento con fármacos citotóxicos. Generalmente dicho tratamiento se denomina quimioterapia.
- 20 El tratamiento local es, por supuesto, una primera etapa en el tratamiento de los tumores sólidos. Esto tradicionalmente se realiza por medio de resección tumoral.
- 25 Otro abordaje es la destrucción del tumor *in situ*. Una característica de la destrucción tumoral *in situ* es que el tumor no se elimina sino que se neurotiza. En principio, la radiación es una forma de destrucción tumoral *in situ*, pero se han desarrollado muchos otros modos de destrucción tumoral- Procedimientos habituales son, por ejemplo, terapia fotodinámica usando la combinación de compuestos fotosensibilizantes y su posterior activación por láser, calentamiento *in situ* por medio de luz láser, microondas, corriente eléctrica, ultrasonidos, ultrasonidos enfocados de alta intensidad o por medio de ondas de radiofrecuencia, o crioterapia: necrotizando el tejido por congelación.
- 30 La destrucción tumoral *in situ* deja la masa tumoral destruida en el cuerpo. Esto deja abierta la posibilidad de intentar y generar una respuesta inmunológica a los antígenos específicos del tumor (inmunoterapia contra el cáncer). La ventaja de una inducción exitosa de dicha respuesta inmunológica a antígenos específicos del tumor es que durará algún tiempo y, en última instancia, eliminará la localización del tumor en otros puntos del cuerpo en los que no se puede usar la destrucción tumoral.
- 35 No obstante, al contrario de que lo que se conoce a partir del desarrollo de vacunas que se basa en antígenos no propios, la inducción de una respuesta inmunitaria contra los antígenos tumorales está lejos de ser fácil.
- 40 Básicamente, los antígenos tumorales son componentes del cuerpo principalmente normales: autoantígenos. Por tanto, el sistema inmunitario como tal regulará por disminución la respuesta inmunitaria autodirigida que conduce a un estado tolerante para los autoantígenos.
- Por consiguiente, el desarrollo de la inmunoterapia para el cáncer basada en la destrucción tumoral requiere un abordaje muy específico.
- 45 En realidad, actualmente se considera que los oligodesoxinucleótidos de citidilguanosilo no metilados (ODN CpG) son, con mucho, el grupo específico más preferido de compuestos de inmunopotenciación capaces de inducir una respuesta inmunitaria contra los autoantígenos específicos del tumor.
- 50 Estos oligodesoxinucleótidos de citidilguanosilo actúan como agonistas del receptor 9 de tipo Toll (TLR9). Los motivos CpG destacan por su inducción preferencial de respuestas Th1 y los linfocitos T CD8+ específicos del tumor. El TLR9 se expresa predominantemente en los linfocitos B y las células dendríticas (CD) que internalizan y responden directamente a los motivos CpG. Tras desencadenar el TLR9, las CD maduran y migran hasta ganglios linfáticos de drenaje en los que presentan los antígenos a los linfocitos T y B- Es importante el hecho de que estas CD adquieren la capacidad única para presentar los antígenos capturados sobre moléculas del MHC de clase I, un proceso conocido como presentación cruzada, que es crucial para un primado eficiente de los LTC específicos del tumor. Como tal, se ha notificado que la administración de CpG previene el sobrecrecimiento tumoral en un contexto profiláctico y también podrían erradicar los tumores establecidos en ratones. Nierkens, S. y col., (Cancer Res. 68: 5390-5396 (2008)) y Roux, S. y col., (Cancer Immunol. Immunoth. 57: 1291-1300 (2008))
- 55
- 60 No obstante, hay algunos posibles problemas de seguridad con respecto al uso de ODN CpG que, entre otras cosas, incluyen la inducción de anticuerpos anti-ADN y autoinmunidad. Además, su toxicidad cuando se administra en cantidades mayores y durante un periodo de tiempo más prolongado, así como los costes implicados en su uso, son motivos de preocupación.
- 65 Por tanto, existe la necesidad de otros compuestos de inmunopotenciación.

La presente invención proporciona medios para disminuir o superar los problemas mencionados anteriormente.

Dado el papel clave de TLR9 y sus agonistas en la inducción de una respuesta inmunológica frente a antígenos específicos del tumor tras la destrucción tumoral *in situ*, el experto consideraría un requisito previo que dichos otros compuestos de inmunopotenciación actúen también como agonistas de TLR9. Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que las saponinas, que no tienen ninguna relación con el mecanismo del TLR9, son, no obstante, muy adecuadas para inducir una respuesta inmunológica a autoantígenos específicos de tumor tras la destrucción tumoral. Incluso más inesperadamente, su efectividad, aunque a través de mecanismos desconocidos, parece ser comparable, o incluso mejor, que la de los CpG.

Se descubrió que la administración de saponinas dentro o alrededor de un tumor, en el momento o alrededor del momento de la destrucción tumoral, induce una respuesta inmunológica muy significativa a los antígenos específicos del tumor tras la destrucción tumoral *in situ*. Esta respuesta inmunológica es duradera y, por tanto, es muy adecuada para eliminar las células metastatizadas, incluso si dichas células han estado latentes presentes en el cuerpo. Además, esta respuesta inmunológica parecía ser lo bastante fuerte para prevenir la multiplicación del mismo tipo de células tumorales, incluso si estas se administran deliberadamente en cantidades sustanciales varias semanas tras el tratamiento.

Hasta ahora solo se ha descrito a las saponinas como adyuvantes contra antígenos no propios; por ejemplo en vacunas bacterianas o víricas. Bachran, C. y col., (Medicinal Chemistry 8:575-584 (2008) han descrito el uso de saponinas como citotoxinas para matar células tumorales. En la solicitud de PCT WO 2008/063129 se describe el uso de saponinas en partículas que contienen lípidos como citotoxinas para matar las células tumorales.

No obstante, en la presente invención su efecto citotóxico no es de relevancia, ya que la saponina se usa en combinación con células que ya han muerto en el proceso de destrucción tumoral. Dado que su efecto citotóxico no desempeña ningún papel, de todas formas no cabría esperar ningún efecto sobre el tumor destruido. Además, el efecto citotóxico de las saponinas en la quimioterapia solo funciona en el momento de la administración. No generan una respuesta inmunológica y, por tanto, no actúan contra células metastatizadas que temporalmente tienen una actividad metabólica baja; células latentes.

El papel de las saponinas en la inducción de una respuesta inmunológica a los autoantígenos específicos del tumor, tras la destrucción tumoral *in situ*, ha sido hasta la fecha desconocido y, por las razones mencionadas anteriormente, no podía preverse.

Por tanto, una primera realización de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas para usar en terapia de destrucción tumoral *in situ*, que comprende las etapas de destrucción tumoral y administración de una cantidad inmunoestimulante de una inmunopotenciación que está contenida en la composición farmacéutica, en la que dicho inmunopotenciador es una saponina.

La saponina es, en principio, el nombre genérico de un grupo de glicósidos vegetales, de los que la saponina de Quillaja saponaria es la más antigua y la más usada.

En realidad, la saponina bruta es una mezcla de saponinas que comparten la misma estructura básica pero que tienen diferentes cadenas laterales. Los diferentes componentes de la saponina difieren principalmente en su grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad.

La HPLC es un procedimiento preferido para detectar y aislar los diversos componentes de la saponina a partir de una mezcla de saponina bruta. Varios extractos purificados tales como QS-7, -17, -18, -21, GPI-0100, QuilA, Ovac y BioO están disponibles comercialmente de varias Fuentes.

Preferentemente, la saponina comprende al menos uno de los componentes siguientes: QS-7, QS-17, QS-18 o QS-21.

Saponinas también preferidas son QuilA y componentes de los mismos, Vax Sap, SuperSap, GPI-0100, QP UF 1000 y similares.

Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención, en la que la saponina comprende al menos uno de los componentes siguientes: QS-7, QS-17, QS-18, QS-21, QuilA, Vax Sap, SuperSap, GPI-0100 o QP UF 1000.

Otra atractiva forma de inmunoestimulación de la saponina son los denominados complejos estimulantes inmunitarios vacíos (ISCOMS vacíos). Las preparaciones de complejos estimulantes inmunitarios vacíos difieren de la saponina en que están formados por una mezcla de saponina, lípido y colesterol. Durante su preparación se forman pequeñas partículas de tipo micela, que son incluso más inmunopotenciadoras que la saponina como tal.

Por tanto, otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención, en la que la saponina está en forma de un complejo inmunoestimulante vacío.

5 No hace falta decir que la presente invención es igualmente aplicable en el campo tanto de la medicina humana como veterinaria.

10 En vista de los diferentes modos de acción de las saponinas por un lado y de los ODN CpG por otro, no se podría esperar ningún efecto potenciador de la administración combinada de los dos. No obstante, sorprendentemente, se descubrió que había un fuerte efecto sinérgico en el uso combinado de saponina y ODN CpG.

15 Esta inesperada sinergia es ventajosa porque posibilita usar cantidades inferiores a las convencionales de ODN CpG cuando se administran en combinación con saponina. A su vez, esto disminuye claramente las desventajas del uso de ODN CpG que se han mencionado anteriormente. A la luz de esto, el uso de ODN CpG se hace de nuevo atractivo siempre que se administren en combinación con saponina.

20 El uso de saponina en combinación con CpG se ha descrito como adyuvante para la inducción de una respuesta inmunitaria contra antígenos no propios en la patente de EE.UU. US 7049302, pero, por las razones indicadas anteriormente, podría esperarse un efecto combinado, por no hablar de un efecto de sinergia, contra los autoantígenos.

Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la invención que, además, comprende ODN CpG.

25 Los ODN CpG para usar en la estimulación inmunitaria se han descrito desde 1994 (patente de EE.UU. US6429199). Los motivos de CpG básicamente tienen la estructura 5'-X<sub>1</sub>-C-pG-X<sub>2</sub>-3'. Se sabe que el motivo CpG 5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr está entre los más inmunopotenciadores (Scheule, R.K., *Advanced Drug Delivery Reviews* 44: 119-134 (2000)). Básicamente, su longitud es de 8-80 bases y contienen al menos un motivo CpG no metilado.

30 Con frecuencia se ven pequeñas diferencias de eficiencia en diferentes especies animales. Simplemente como ejemplo, el TLR9 humano es desencadenado óptimamente por el motivo CpG G-T-CpG-T-T, mientras que el TLR9 es desencadenado más óptimamente por G-A-CpG-T-T (Krieg, A.M., *Nature Medicine* 9: 831-835 (2003)).

35 Rankin, R., y col., en *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 11: 333-340 (2001) han descrito los motivos CpG óptimos para siete especies veterinarias y tres de laboratorio. Wernette, C.M., y col., en *Veterinary Immunol and Immunopath.* 84: 223-236 (2002) describen los motivos CpG que estimulan con eficiencia la proliferación de células inmunitarias caninas y felinas. Ameiss, KA, y col., en *Veterinary Immunol. and Immunopath.* 110: 257-267 (2006) se han descrito aplicaciones para motivos CpG.

40 Los ODN de CpG con diferentes motivos CpG están fácilmente disponibles comercialmente y, si se desea, se sintetizan con facilidad. Cantidades adecuadas de ODN CpG se pueden encontrar en, entre otras, las publicaciones mencionadas anteriormente y en la sección de Ejemplos.

45 De nuevo, como se ha mencionado anteriormente, no es necesario decir que la presente invención se puede aplicar igualmente en el campo de la medicina humana y veterinaria, aunque es aconsejable (aunque no obligatorio) la equivalencia del motivo CpG usado con la especie animal para la que se usa la invención. Esto se puede realizar fácilmente en base a las publicaciones resumidas anteriormente.

50 En principio, las etapas de la destrucción tumoral y la administración de un inmunopotenciador se pueden realizar en diferentes momentos en el tiempo o al mismo tiempo. No obstante, en teoría, cabría esperar que acondicionar un tumor con el inmunopotenciador varios días o, mejor, una semana o incluso dos o más semanas antes de aplicar la destrucción tumoral, con el objetivo de "primar" el sistema inmunitario, fuera la vía preferida.

55 No obstante, sorprendentemente se descubrió que si la administración del inmunopotenciador se realiza después de la destrucción tumoral, en un plazo de días tras la destrucción tumoral, preferentemente en el plazo de un día, más preferentemente en el plazo de 12 horas, incluso más preferentemente en el plazo de 6 horas, todavía incluso más preferentemente en el plazo de 2 horas desde la destrucción tumoral, el nivel de inmunoestimulación es mejor que cuando se invierte el orden de las etapas.

60 También se obtienen buenos resultados cuando el inmunopotenciador se administra entre aproximadamente dos horas antes de la destrucción tumoral y el momento de la destrucción. Esto es porque tras la destrucción, es posible que sea más difícil llegar o entrar en la masa neoplásica debido a los cambios de su estructura inducidos por la destrucción.

65 La administración del inmunopotenciador en el intervalo entre 2 horas antes y dos horas después de la destrucción tumoral se denomina administración perioperatoria.

Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para usar en la destrucción tumoral *in situ*, que comprende las etapas de destrucción tumoral y administración de un inmunopotenciador de acuerdo con la invención, en la que dichas etapas están en el orden siguiente:

- 5           a. destrucción del tumor  
               b. administración de un inmunopotenciador.

Formas más preferidas de esta realización se refieren a las etapas en el orden como se ha mencionado anteriormente, en el que la administración de un inmunopotenciador sigue en 24 horas, 12 horas o incluso 6 horas tras la destrucción tumoral, en este orden de preferencia.

Asimismo, otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para usar en la destrucción tumoral *in situ*, que comprende las etapas de destrucción tumoral y administración de un inmunopotenciador de acuerdo con la invención, en la que dichas etapas son:

- 15           a. Administración perioperatoria del inmunopotenciador  
               b. destrucción del tumor

Con respecto al sitio o sitios de administración del inmunopotenciador se deberán realizar las consideraciones siguientes:

Preferentemente, el inmunopotenciador se administra directamente en la masa neoplásica. Aunque ligeramente menos preferida, la administración peritumoral en la que el inmunopotenciador se administra en una o más localizaciones alrededor de la masa neoplásica también es posible. Otra administración, aunque menos preferida, es la administración subcutánea en el área de drenaje de la masa neoplásica. Por último, es posible la administración intravenosa, preferentemente cerca de la localización de la masa neoplásica.

Por tanto, dicha administración del inmunopotenciador tiene lugar mediante administración intravenosa, administración subcutánea en el área de drenaje de la masa neoplásica, administración peritumoral o administración intratumoral en dicho orden de preferencia creciente.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que sufre cáncer, en el que el mamífero se ha sometido a destrucción tumoral.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que sufre cáncer, en el que el mamífero se ha sometido a destrucción tumoral.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Ratones y células tumorales*

45 Los ratones C57BL/6n (de 6-8 semanas de edad) se adquirieron en Charles River Wiga (Sulzfeld, Alemania) y se mantuvieron en condiciones específicas de barrera sin patógenos en el Central Animal Laboratory (Nijmegen, Países Bajos). Se proporcionó agua de bebida y alimento de laboratorio estándar *ad libitum* y se dejó a los ratones descansar durante al menos 1 semana antes de la asignación aleatoria a grupos específicos de tratamiento. Los experimentos se retiraron de acuerdo con las guías para atención animal del Comité de Experimentos con Animales Nijmegen.

50 La línea celular de melanoma mutilo B16F1 0 (ATCC) se cultivó en medio complete (MEM, 5 % de suero bovino fetal (Greiner Bio-one), 100 U7ml de penicilina G sódica y 100 µg/ml de estreptomina (Pen/Strep), piruvato sódico MEM (1 mM), NaHCO<sub>3</sub>, vitaminas MEM, aminoácidos no esenciales MEM (todos de Gibco), β-mercaptoetanol (β-ME) 20 µM).

#### *Modelo de tumor y criocirugía*

60 Las células tumorales se suspendieron en una mezcla de PBS y Matrigel (2:1) y 0,5\*10<sup>6</sup> células en un volumen total de 50 µl se inyectaron s.c. en el fémur derecho. Cuando los diámetros del tumor medían 6 – 8 mm (generalmente el día 9 – 10), se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento. Se realizó crioblación (Crio) con anestesia isoflurano/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O usando un sistema de crioblación en nitrógeno líquido (CS76, Frigironics, Shelton, CT) del que la punta se enfría mediante un flujo continuo de nitrógeno líquido en circulación. Durante 2 ciclos de tratamiento de congelación y descongelación, el tumor se congeló macroscópicamente dejando el tejido sano circundante intacto. Para monitorizar la inducción de protección tumoral duradera se volvió a exponer a los ratones a 15\*10<sup>3</sup> células

B160VA o B16F10 40 días después de la crioblación. Las reexposiciones se inyectaron en 100 µl de PBS s.c. en el flanco derecho. Se sacrificó a los ratones cuando el volumen del tumor superó los 1000 mm<sup>3</sup> o cuando los tumores rompieron la barrera de la piel.

5 *Inyección de adyuvante*

10 CpG 1668 ('5-TCCATGACGTTTCCTGATGCT3') con una estructura total modificada con fosforotioato se adquirió en Sigma Genosys (Haverhill, UK). CpG se inyectó por vía peritumoral en PBS (p.t., 30 µg divididos en 2 inyecciones de 10 µl bordenado el tumor sometido a ablación). Se usaron los adyuvantes siguientes (todos suministrados por Intervet BV, Boxmeer): una emulsión de de agua en aceite basada en aceite mineral ((Marcol 52) (1y una emulsión de agua en aceite basada en aceite no mineral (Miglyol 840) (1); una emulsión de aceite en agua usando aceite mineral, una emulsión de aceite en agua usando escualeno (2); y una emulsión de aceite en agua usando acetato de vitamina E (3); Matriz C 750 µg/ml (Isconova); saponina Quil A (Brenntag) 500 µg/ml; hidróxido de aluminio (Brenntag) 0,75% (p/v) ; o fosfato de aluminio(Brenntag) 0,75% (p/v).

15 En este artículo se mezclaron las dos emulsiones de agua en aceite en una proporción de 1:1 y las tres emulsiones de aceite en agua se mezclaron en una proporción de 1:1:1.Los adyuvantes basados en aluminio se usaron mezclados en una proporción de 1:1, pero también por separado. Todos los adyuvantes no microbianos (o mezclas de ellos) se inyectaron p.t. (40 µl divididos en 2 inyecciones de 20 µl, separados espacialmente de las inyecciones de ODN CpG). Todas las inyecciones se realizaron en los 30 minutos posteriores a la ablación (1: Jansen y col., Vaccine, 23,1053-1060,2005, 2: O'Hagan Expert Re. Vaccines, 6, 669 - 710, 2007, 3: Rijke y col. en Adv. Avian Immunol. Res. Eds. T.F. Davison, N. Bumstead y P. Kaiser 265-271,1995).

25 *Análisis estadísticos*

Las curvas de supervivencia de Kaplan Meier se analizaron usando una prueba del orden logarítmico.

*Resultados:*

30 Como se deduce claramente de las gráficas de la figura 1, la combinación de destrucción tumoral y la administración de ODN CpG como inmunopotenciador conduce a un índice de supervivencia inferior al 50 % tras 80 días. Además, no hay un equilibrado significativo de la curva de supervivencia (Fig. 1a).

35 La combinación de destrucción tumoral y la administración de los adyuvantes de aceite en agua, de agua en aceite i de AIOH como inmunopotenciadores condujeron a menos protección (Fig. 1by 1c).

40 No obstante, la combinación de destrucción tumoral y la administración de saponina, sea en forma de QuilA o como complejos estimulantes inmunes vacíos, como inmunopotenciador conduce a un impresionante índice de supervivencia de > 75 % tras 80 días. Además, en este caso hay un equilibrado significativo de la curva de supervivencia (Fig. 1c).

45 La combinación de destrucción tumoral y la administración combinada de CpG y saponina, sea en forma de QuilA o como complejos estimulantes inmunes vacíos, como inmunopotenciador conduce a un índice de supervivencia todavía mayor de > 90% tras 80 días y una estabilización muy fuerte de la curva de supervivencia (Fig. 1d).

**Leyendas de las figuras**

50 Figura 1. Potente inmunidad antitumoral tras ablación combinada con adyuvantes basados en ODN-CpG y en saponina. Tumores B16F 10 establecidos sobre el fémur derecho se trataron con crioblación solo, en combinación con CpG o en combinación con los adyuvantes no microbianos indicados. Cuarenta días después, los ratones no tratados y sin tumor recibieron una reexposición s.c. a células tumorales (15.000 células B16F10) en el flanco. El tamaño del tumor se monitorizó cada 2 – 4 días.

55 (a) Curva de supervivencia de Kaplan-Meier en la que se demuestra protección limitada del sobrecrecimiento tumoral tras ablación solo o en combinación con ODN CpG.

(B) Curvas de supervivencia que demuestran una protección limitada o ausencia de protección del sobrecrecimiento tumoral tras ablación solo o en combinación con los adyuvantes mixtos de aceite en agua, agua en aceite o de aluminio.

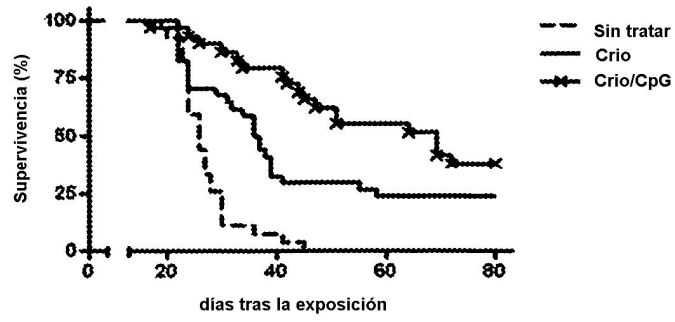
60 (C) Curva de supervivencia que demuestra protección relativa del sobrecrecimiento tumoral tras ablación solo o en combinación con los adyuvantes (mixtos) indicados. Los adyuvantes basados en saponina muestran la protección más potente.

65 (D) Curva de supervivencia que demuestra protección adicional cuando la ablación en combinación con los adyuvantes a base de saponina se combina con coadministración de ODN-CpG. \* = p < 0,05 comparado con crio, \*\* = p < 0,001 comparado con crio/CpG. Se obtuvieron datos comparables en tres experimentos independientes.

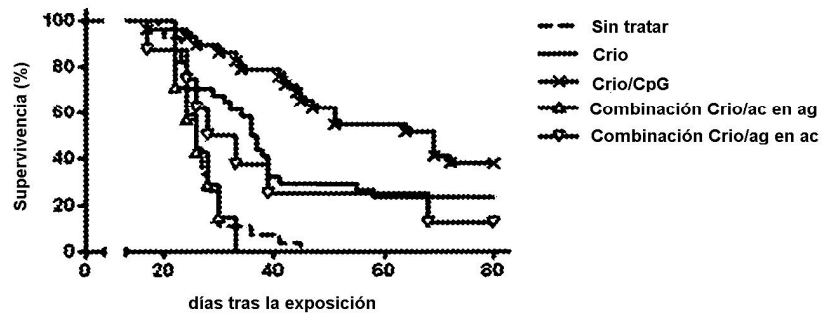
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica para usar en terapia de destrucción tumoral in situ, que comprende las etapas de destrucción tumoral y de administración de una cantidad inmunoestimulante de un inmunopotenciador, en la que la composición farmacéutica comprende el inmunopotenciador y en la que dicho inmunopotenciador es una saponina.
- 10 2. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha saponina comprende al menos uno de los componentes siguientes: QS-7, QS-17, QS-18, QS-21, OuilA, Vax Sap, SuperSap, GPI-0100 o QP UF 1000.
- 15 3. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la saponina está en forma de un complejo estimulante inmune vacío.
4. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición farmacéutica además comprende un oligodesoxinucleótido de citidilguanosilo no metilado (ODN CpG).
- 20 5. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** dichas etapas van en el orden siguiente:
- c. destrucción del tumor
  - d. administración de un inmunopotenciador
- 25 6. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicha etapa de administración de un inmunopotenciador sigue en un plazo de 24 horas a la destrucción tumoral.
7. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicha etapa de administración de un inmunopotenciador sigue en un plazo de 12 horas a la destrucción tumoral.
- 30 8. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** dicha etapa de administración de un inmunopotenciador sigue en un plazo de 6 horas a la destrucción tumoral.
9. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** dichas etapas son:
- 35
  - c. administración perioperatoria del inmunopotenciador
  - d. destrucción del tumor
- 40 10. Composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el sitio de administración del inmunopotenciador es intravenosa, subcutánea en el área de drenaje de la masa neoplásica, peritumoral o intratumoral, en dicho orden de preferencia creciente.
- 45 11. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que sufre cáncer, en la que el mamífero se ha sometido a destrucción tumoral.
- 50 12. Uso de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la fabricación de un medicamento para administración perioperatoria para el tratamiento de un mamífero que sufre cáncer, en la que el mamífero se ha sometido a destrucción tumoral.

**A**



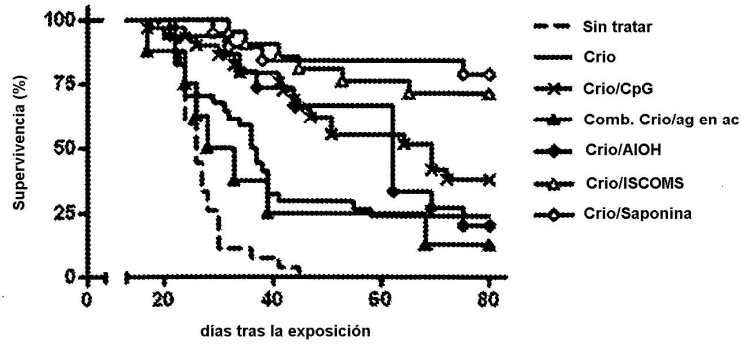
**B**



**FIGURA 1**



C



D

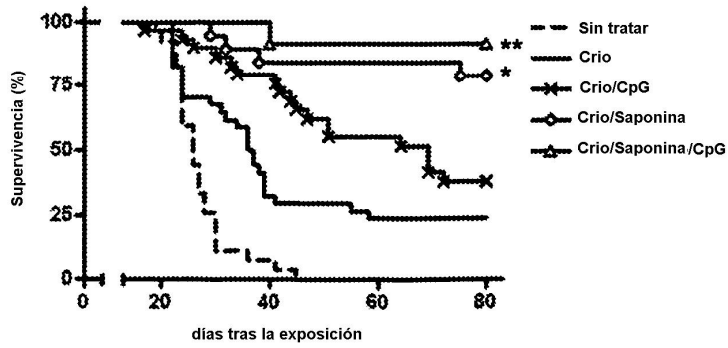
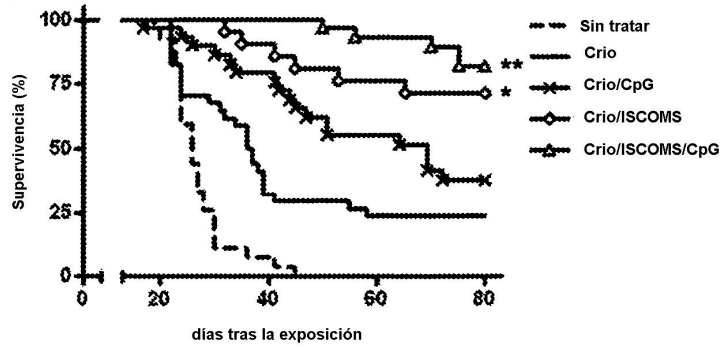


FIGURA 1